

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



**Niveles elevados de Sfrp1 en un modelo
transgénico de ratón desencadenan
neuroinflamación y pérdida de memoria**

María Inés Mateo Ruiz

Madrid, 2019

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Niveles elevados de Sfrp1 en un modelo transgénico
de ratón desencadenan neuroinflamación y pérdida
de memoria**

Memoria presentada por:

María Inés Mateo Ruiz

Graduada en Biología

para optar al título de Doctora en Biociencias Moleculares

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de tesis:

Prof. Dra. Paola Bovolenta Nicolao

Dra. Pilar Esteve

Trabajo realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-
UAM)

A mi familia

RESUMEN

El aumento de la esperanza de vida en la población ha generado un crecimiento significativo en la aparición de patologías neurodegenerativas asociadas a la edad, donde la más prevalente es la enfermedad de Alzheimer (EA). Por ello, es necesario comprender mejor los cambios moleculares y celulares que conducen al envejecimiento, con el fin de conseguir tratamientos que prevengan, retrasen y/o atenúen los trastornos asociados, como el deterioro cognitivo.

Durante esta tesis hemos estudiado la posible implicación de SFRP1 como molécula responsable del envejecimiento cerebral. SFRP1 es una proteína secretable y altamente difusible implicada en senescencia e inflamación. Además, regula la vía de señalización de Wnt y modula negativamente ADAM10, una metaloproteasa encargada del procesamiento de múltiples sustratos, como la proteína precursora amiloide (APP) o proteínas relacionadas con inflamación y plasticidad sináptica. Estudios recientes de nuestro laboratorio, han demostrado que SFRP1 participa en la patogénesis de la EA, mostrando un aumento significativo de su expresión en extractos cerebrales de pacientes. Por el contrario, la neutralización de su actividad en un modelo murino de amiloidogénesis induce una mejora significativa en la acumulación de placas amiloides, neuroinflamación y plasticidad sináptica.

Para definir si *Sfrp1* tiene un efecto directo sobre la neuroinflamación y la plasticidad sináptica, independientemente de la generación de productos amiloideos tóxicos (A β), generamos un modelo transgénico murino que sobre-expresara *Sfrp1* en astrocitos, GFAP-tTA/TRE-*Sfrp1*. La caracterización de este modelo muestra un aumento significativo en su expresión dependiente del número de alelos. Con el envejecimiento, altos niveles de *Sfrp1* inducen astrogliosis y microgliosis, así como un aumento en la expresión de marcadores de inflamación como tau-hiperfosforilado, fosfo-p38 y citoquinas pro-inflamatorias como TNF α . Los ratones GFAP-tTA/TRE-*Sfrp1* presentan una disminución del mRNA de genes relacionados con la EA como neuroglobina, TMEM106b y CYP46A1. Estas alteraciones bioquímicas y morfológicas están asociadas a una reducción en la complejidad del árbol dendrítico de neuronas hipocámpales y del número de espinas dendríticas, que además presentan modificaciones en su morfología. Estas alteraciones están asociadas a una disminución en sus capacidades cognitivas.

RESUMEN

En su conjunto, estos resultados indican que niveles elevados de Sfrp1 son capaces de provocar alteraciones moleculares y funcionales similares a las asociadas a procesos patológicos del envejecimiento cerebral, indicando que SFRP1 podría ser una buena diana terapéutica para frenar el progresivo deterioro cognitivo asociado.

ABSTRACT

The increase in human life expectancy has led to an escalation of neurodegenerative pathologies associated with age, among which Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent. A better knowledge of the molecular and cellular changes that lead to ageing, is therefore necessary to develop treatments that prevent, delay and/or mitigate age related disorders such as cognitive impairment.

In this dissertation, we have analysed the possible role of SFRP1 in brain ageing. SFRP1 is a secreted and highly dispensable protein implicated in senescence and inflammation. In addition, SFRP1 regulates Wnt signalling and negatively modulates ADAM10, a metalloprotease that cleaves several substrates, such as the amyloid precursor protein (APP) or proteins related to inflammation and synaptic plasticity. Recent studies of our laboratory, have proven that SFRP1 contributes to AD pathogenesis, showing a significant increase of its expression in brain extract from AD patients. Furthermore, neutralization of its activity in a murine model of amyloidogenesis induces a significant improvement in amyloid plaque accumulation, neuroinflammation and synaptic plasticity.

We have generated a murine transgenic model that overexpresses *Sfrp1* in astrocytes, GFAP-tTA/TRE-*Sfrp1*, to test the possible effect of this protein on neuroinflammation and synaptic plasticity. The characterization of this model demonstrates a significant and allele dependent increase *Sfrp1* expression. With ageing, *Sfrp1* induces astrogliosis and microgliosis, and an increase in the expression of inflammatory indicators such as tau-hyperphosphorylated, phospho-p38 and pro-inflammation cytokines such as TNF α . Moreover, there is a reduction in the mRNA of genes related to the EA, such as neuroglobin, TMEM106b and CY46A1. These biochemical and morphological alterations were associated to a reduction of the dendritic tree of hippocampal neurons and in the dendritic spine numbers with morphological alterations. Associated to these alteration mice show a reduction of their cognitive abilities.

In conclusion, these result show that high *Sfrp1* levels lead to molecular and functional alterations that are similar to those found in a brain ageing and suggest that SFRP1 could be a potential therapeutic target to slow down the progressive cognitive worsening associated to AD.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	25
1. Envejecimiento cerebral	27
1.1. Neuroinflamación.....	30
1.2. Plasticidad sináptica	33
1.3. Senescencia.....	36
2. Secreted Frizzled Related Protein 1	37
2.1. Sfrp1 durante el envejecimiento y otras patologías.....	39
2.2. Papel de Sfrp1 en la enfermedad Alzheimer.....	40
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Anticuerpos	51
2. Muestras de pacientes.....	52
3. Animales	52
3.1. Características y mantenimiento.....	52
3.2. Administración comida alta en grasa.....	53
3.3. Genotipado mediante PCR.....	54
3.4. Extracción líquido cefalorraquídeo, sacrificio de ratones y disección del tejido.....	54
4. Inyecciones estereotáxicas de Sindbi virus	55
5. Inmunofluorescencia	56
5.1. Análisis del número de sinapsis.....	57
5.2. Análisis morfológico de las neuronas	57
5.3. Análisis de las espinas dendríticas.....	58
5.4. Análisis fagocitosis de terminales sinápticos	58
6. Western Blot.....	59
6.1. Preparación de sinaptosomas y co-inmunoprecipitación.....	59
7. Pruebas de comportamiento	60
7.1. Rotarod.....	60
7.2. Test de sociabilidad	61
7.3. Test de laberinto en cruz elevado (<i>Elevated Plus Maze</i>).....	62

7.4.	Prueba de la Y (Y-maze)	62
7.5.	Test de discriminación de patrones (<i>Novel object localation test</i>)	63
7.6.	Test de reconocimiento de objetos (<i>Object recognition test</i>)	64
7.7.	Test de miedo condicionado (<i>Contextual Fear conditioning</i>)	64
8.	Ensayos de ELISA tipo sandwich.....	65
9.	qRT-PCR	66
10.	Análisis estadísticos	67
RESULTADOS.....		69
1.	Los niveles de SFRP1 aumentan durante la progresión de la EA	71
2.	Generación y validación de un modelo murino de sobre-expresión de Sfrp1 en cerebro	73
2.1.	Generación de un ratón doble transgénico murino GFAP-tTA/TRE-Sfrp1	73
2.2.	Validación del modelo murino doble transgénico GFAP-tTA/TRE-Sfrp1.....	75
2.3.	Sfrp1 no modula la vía Wnt/ β catenina. Sfrp1 interacciona con ADAM10.....	78
3.	Consecuencias morfológicas y funcionales de la sobre-expresión de Sfrp1 en el cerebro....	79
3.1.	Sfrp1 induce neuroinflamación	79
3.2.	Sfrp1 altera la morfología de las neuronas	83
3.3.	La sobre-expresión de Sfrp1 provoca una disminución en la densidad de espinas dendríticas.....	85
3.4.	La sobre-expresión de Sfrp1 en astrocitos provoca una reducción en el número de sinapsis.....	86
3.5.	Sfrp1 aumenta los niveles de poda sináptica	89
3.6.	Sfrp1 induce deterioro cognitivo y alteraciones comportamentales	91
3.7.	Sfrp1 induce alteraciones en la expresión génica	97
4.	La combinación de Sfrp1 y un factor de riesgo para el envejecimiento, como es la obesidad, no agrava el deterioro cognitivo	98
DISCUSIÓN		101
1.	Función patológica de la proteína Sfrp1 en el cerebro	104
2.	Posible mecanismo molecular de Sfrp1	108
3.	Sfrp1 como diana terapéutica contra la EA.....	111
CONCLUSIONES		113
BIBLIOGRAFÍA		117

ABREVIATURAS

A β : *β -amyloid / β -amiloide*

ADAM10: *A Disintegrin and metalloproteinase*

AMPA: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

APP: *Amyloid Precursor Protein / Proteína precursora amiloide*

BB: *Braak and Braak*

BBB: Barrera hematoencefálica

DAG: Dieta alta en grasa

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide / Dimetilsulfito*

EA : Enfermedad Alzheimer

ECL: *Enhanced Chemiluminescence Detection System*

EPM: *Elevated Plus Maze / Test de laberinto en cruz elevado*

Fz: *Frizzled*

GABA: *Gamma-aminobutyric acid/ Ácido gamma aminobutírico*

GD: Giro dentado

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein / Proteína ácida fibrilar glial*

GFP: *Green Fluorescent Protein/ Proteína fluorescente verde*

HCl: *Hydrochloric Acid / Ácido clorídrico*

HRP: *Horseradish Peroxidase/ Peroxidasa de rábano*

IL: Interleucina

IF: Inmunofluorescencia

IFN: Interferón

LCR: *Cerebrospinal Fluid / Líquido cefalorraquídeo*

LTD: *Long Term Depression/ Depresión a largo plazo*

LTP: *Long Term Potentiation/ Potenciación a largo plazo*

NMDA: *N-methyl-D-aspartate*

ABREVIATURAS

NTR: *Netrin-related motif*/ Motivo relacionado con las netrinas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: *Phosphate Buffered Saline* / Tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa

PCOLCE: Proteína potenciadora de la proteinasa C procolágeno

PFA: *Paraformaldehyde*/ Paraformaldehído

PSDs: *Postsynaptic Densities*/ Densidades postsinápticas

SNC: Sistema nervioso central

TGF: *Transforming growth factor* / Factor de crecimiento transformante

TNF α : *Tumor Necrosis Factor* / factor de necrosis tumoral

TMB: *Tetremethylbenzidine* / Tetrametilbencidina

qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*/ PCR cuantitativa

SASP: *Senescence-Associated Secretory Phenotype* / fenotipo secretor asociado a senescencia

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*/ Dodecil sulfato sódico

SFRP: *Secreted Frizzled Protein*

TIMPS: *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* / inhibidores tisulares de las metaloproteasas

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TBS: *Tris Buffer Saline*

WB: *Western* *Blot*

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso universal e irreversible de carácter multifactorial y complejo, que se caracteriza por una disminución lenta y progresiva de la capacidad regenerativa y funcional de tejidos y órganos. Está caracterizado, entre otros rasgos, por una reducción en la función inmunológica y, por tanto, una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones, pérdida de masa corporal, retraso en la cicatrización de heridas y una disminución de las capacidades cognitivas, como son los procesos de aprendizaje y memoria. Los avances en ciencia y tecnología, así como las mejoras en las condiciones de higiene y alimentación han permitido el aumento de la esperanza de vida de la población en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre el año 2020 y 2050 se triplicará la población mundial mayor de 60 años. La consecuencia del aumento de la edad media en la población es el incremento de patologías asociadas con la edad, entre otros, los trastornos neurodegenerativos como el glaucoma o las enfermedades Alzheimer y Parkinson.

1. Envejecimiento cerebral

El cerebro es un órgano muy complejo compuesto por una red organizada de neuronas, células gliales (microglia, astrocitos y oligodendrocitos) y vasos sanguíneos, que en su conjunto, son responsables de mantener su integridad y función (Yankner et al., 2008). Al igual que sucede en el resto de los órganos y tejidos del organismo, la funcionalidad del cerebro disminuye progresivamente durante el envejecimiento, reduciendo la calidad de vida de las personas. Este proceso se caracteriza por un declive en la percepción sensorial y coordinación motora, un deterioro en el procesamiento cognitivo (de aprendizaje y memoria) y en la prevalencia de alteraciones de otros aspectos comportamentales como un aumento de la ansiedad y la depresión (Satoh et al., 2017, Morrison and Baxter, 2012). Análisis histológicos revelaron la existencia, durante el envejecimiento, de una progresiva atrofia cerebral, caracterizada por la pérdida tanto de sustancia blanca como gris, principalmente en la corteza prefrontal y en el hipocampo (O'Shea et al., 2016, Pini et al., 2016). El correcto funcionamiento de estas regiones cerebrales es imprescindible en los procesos de memoria y aprendizaje.

El envejecimiento resulta de la acumulación de daños celulares y moleculares a lo largo del tiempo debido a la suma de factores genéticos y ambientales, como el estilo de vida, la dieta o la exposición a toxinas entre otros (Shadyab and LaCroix, 2015, Wahl et al., 2016). Se ha demostrado que el ejercicio aeróbico aumenta el volumen del hipocampo, acompañado de una mejora en la capacidad cognitiva. Por el contrario, trastornos como la obesidad son capaces de acelerar la atrofia cerebral, correlacionando con un peor rendimiento cognitivo (Mattson and Arumugam, 2018).

El hipocampo es la región cerebral considerada como “la puerta de entrada a la memoria”, encargándose de procesar y codificar la información recibida antes de ser almacenada en otras regiones neocorticales del cerebro. La memoria a corto plazo es el proceso que nos permite retener una cantidad limitada de información durante un periodo corto de tiempo. Si esta información se retiene por más tiempo se genera la memoria a largo plazo, **que nos permite codificar y retener información ilimitada durante** varios años o toda la vida (Jahn, 2013). Este tipo de memoria, a su vez, está dividida en: memoria implícita o de procesamiento (recuerdos evocados de manera inconsciente, haciendo referencia a las acciones o secuencia de actos aprendidos, como escribir o montar en bicicleta) y memoria explícita o declarativa (recuerdos evocados de manera consciente que, a su vez, está dividida en: semántica, en relación al aprendizaje de significados o vocabulario; o episódica que recoge datos autobiográficos). Durante el envejecimiento se produce un progresivo deterioro cognitivo, que incluye la pérdida de memoria a corto plazo, memoria declarativa, así como la capacidad de aprendizaje y de concentración (Mattson and Arumugam, 2018). Además, se ha demostrado que el hipocampo recibe información de otras estructuras, como el sistema límbico. De esta manera, participa en la modulación de comportamientos de tipo emocional como la respuesta al estrés, la ansiedad y la sociabilidad (Okuyama et al., 2016, Felix-Ortiz et al., 2013). Al igual que la memoria, estos tipos de comportamientos emocionales también se ven alterados durante el envejecimiento, mostrando un aumento en los trastornos de ansiedad y depresión, que conducen a una disminución en la sociabilidad (Krell-Roesch et al., 2016).

Las alteraciones en la función cognitiva durante el envejecimiento no parecen estar relacionadas con una pérdida masiva de neuronas, sino con cambios morfológicos. Las

neuronas presentan una pérdida o regresión en la arborización dendrítica y una reducción en la densidad de las espinas dendríticas (pequeñas y dinámicas protuberancias situadas a lo largo de la superficie de las dendritas que representan el componente post-sináptico de las sinapsis) (Dickstein et al., 2007, Avila et al., 2017). Estas alteraciones correlacionan con una disminución en la transmisión sináptica y, como consecuencia, en el progresivo deterioro cognitivo (Mattson and Magnus, 2006, Kabaso et al., 2009).

El envejecimiento va asociado a numerosos cambios deletéreos para el organismo que se van acumulando con el paso del tiempo. A nivel celular y molecular se caracteriza por la presencia de múltiples alteraciones, que incluyen (Mattson and Arumugam, 2018) (Figura 1):

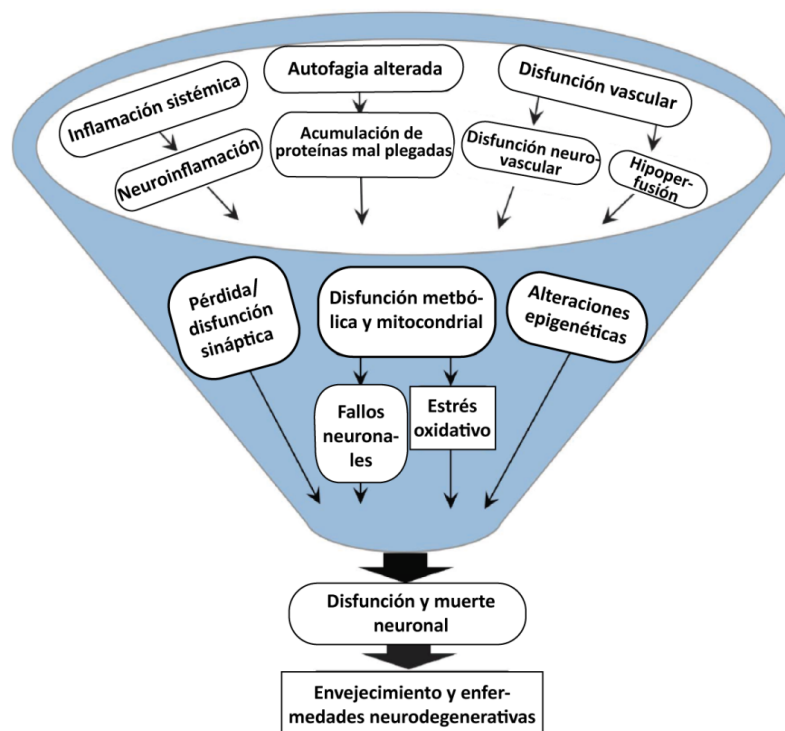


Figura 1. Características del envejecimiento cerebral. La ilustración muestra cambios relacionados con la edad. La suma e interacción de estos procesos conducen al progresivo deterioro cognitivo que observamos durante el envejecimiento. Imagen modificada de (Hara et al., 2019).

- Disfunción mitocondrial, la cual conduce a un aumento en el estrés oxidativo.
- Acumulación intracelular de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos dañados por oxidación.
- Desregulación del metabolismo.

- Deterioro en los procesos de degradación de proteínas.
- Acortamiento de los telómeros y una disminución en la capacidad de reparación del DNA.
- Cambios morfológicos en las neuronas y disminución en la función sináptica.
- Inflamación crónica de bajo grado.
- Acúmulo de células senescentes.
- Alteraciones epigenéticas

Además de todos estos eventos, estudios recientes han demostrado cómo factores presentes en la circulación sanguínea modulan el envejecimiento de distintos tejidos y órganos, incluido el cerebro (Wyss-Coray, 2016). Todos estos cambios ligados a la edad ocurren de una forma más pronunciada en enfermedades neurodegenerativas. De hecho, se hipotetiza que la EA refleja simplemente un envejecimiento acelerado de determinadas regiones cerebrales (Herrup, 2010).

Como hemos visto, son muchos los factores que influyen en el envejecimiento cerebral y contribuyen al deterioro de su funcionamiento. Durante esta tesis nos centraremos en tres de estos factores, la neuroinflamación, plasticidad sináptica y senescencia celular, los cuales son fundamentales en el planteamiento de nuestra hipótesis.

1.1. Neuroinflamación

La neuroinflamación es la respuesta inflamatoria que ocurre tras una perturbación en el sistema nervioso central (SNC) como puede ser una infección, un traumatismo, toxinas u otros estímulos. El SNC responde a estos estímulos con una respuesta inflamatoria aguda de corta duración, mediante la activación y migración de las células gliales (microglia y astrocitos) limitando los daños a la zona implicada. Sin embargo, si el daño persiste se produce una activación prolongada en el tiempo, convirtiéndose en un proceso crónico con efectos degenerativos. Por lo tanto, la neuroinflamación tiene un papel dual, al principio es beneficiosa pero perjudicial si se vuelve crónica (Frank-Cannon et al., 2009) (Figura 2). A continuación, explicaremos con mayor detalle la función de las células gliales encargadas de este proceso:

- **Microglia**

Son células de origen mieloide, consideradas los macrófagos residentes del SNC. Contribuyen al adecuado desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del SNC. Además, representan el sistema de defensa en condiciones patológicas (Ginhoux and Prinz, 2015).

La función principal de la microglia consiste en vigilar constantemente el ambiente en busca de componentes potencialmente dañinos como patógenos, debris celular o agregados proteicos anormales y eliminarlos mediante fagocitosis (Neumann et al., 2009). Además, la microglia contribuye a una correcta función sináptica, secretando factores neurotróficos necesarios para la maduración de las sinapsis excitatorias (Heneka and O'Banion, 2007). También participan en el refinamiento de las conexiones sinápticas mediante un proceso denominado poda sináptica (Hong et al., 2016, Paolicelli and Ferretti, 2017), fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria (Salter and Stevens, 2017). Todas estas funciones están respaldadas por la notable capacidad de la microglia de examinar constantemente el ambiente gracias a sus procesos altamente móviles, típicos de la microglia ramificada (Nimmerjahn et al., 2005).

La activación de la microglia ante cualquier tipo de alteración del SNC, es un proceso complejo caracterizado por un cambio en su morfología, donde las células pasan de estar muy ramificadas a presentar una forma ameboide. Además, tienen una función fagocítica mayor, migran al área afectada (quimiotaxis) y un aumento su proliferación (Ransohoff and Perry, 2009, Kettenmann et al., 2011, Heneka et al., 2014). Una vez activa, la microglia es responsable de la liberación de citoquinas, tanto pro-inflamatorias (IFN γ , IL1 β , TNF α , IL6, IL18, IL12, IL23 y CCL2) como anti-inflamatorias (IL4, IL13, IL10, TGF β), con el objetivo de eliminar el agente dañino y reestablecer la homeostasis del SNC (Heneka et al., 2014).

Durante el envejecimiento la microglia sufre alteraciones funcionales, disminuyendo su función fagocítica, reduciendo su capacidad de quimiotaxis y un presentando una activación exacerbada. Estas características contribuyen con la disfunción cerebral asociada a la edad (Mosher and Wyss-Coray, 2014).

- **Astroцитos**

Los astroцитos tienen origen neuroepitelial y son las células gliales más abundantes (Pinto and Gotz, 2007). Ejercen múltiples funciones vitales para el mantenimiento de la homeostasis del SNC como proporcionar soporte trófico y nutricional a las neuronas, son responsables del metabolismo del glucógeno en el cerebro, regulan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y contribuyen a la homeostasis del calcio. También participan en la transmisión sináptica, regulando el reciclaje de neurotransmisores y modulando la formación, mantenimiento y eliminación de las sinapsis (Bak et al., 2018, Obermeier et al., 2013, Clarke and Barres, 2013, Chung et al., 2013).

Durante la perturbación de la homeostasis del SNC, los astroцитos son capaces de responder rápidamente, participando activamente en la respuesta inflamatoria. La activación de los astroцитos (astrogliosis) se caracteriza por un cambio en su morfología, y por la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias IL6, IL17 y CCL20, quimiocinas y proteasas (Qin and Benveniste, 2012). Además, presentan un cambio en la expresión génica que incluye un aumento en la expresión de la proteína del filamento intermedio glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) un marcador de astroцитos (Cohen and Torres, 2019, Arranz and De Strooper, 2019). En respuesta a diferentes estímulos los astroцитos protegen al SNC a través de la formación de la llamada cicatriz glial. Esta cicatriz facilita la reparación de la BBB, reduce el edema después de un traumatismo y limita la propagación de células infiltradas o agentes infecciosos (Sofroniew, 2009).

En el envejecimiento, los astroцитos se vuelven más reactivos, siendo responsable de este proceso, al menos en parte, la microglia a través de la secreción de IL1 β , TNF α y C1q (Liddelow et al., 2017). La activación de los astroцитos tiene un efecto beneficioso para el SNC, contribuyendo con la recuperación de la homeostasis. Sin embargo, cuando la activación perdura en el tiempo se vuelve deletérea, ya que impide que ejecute sus funciones de manera adecuada, contribuyendo a la disfunción sináptica, perdiendo la capacidad de promover la supervivencia neuronal y produciendo una secreción exacerbada de citoquinas, lo que conduce a un incremento en la inflamación y aumenta la magnitud del daño (Cohen and Torres, 2019).

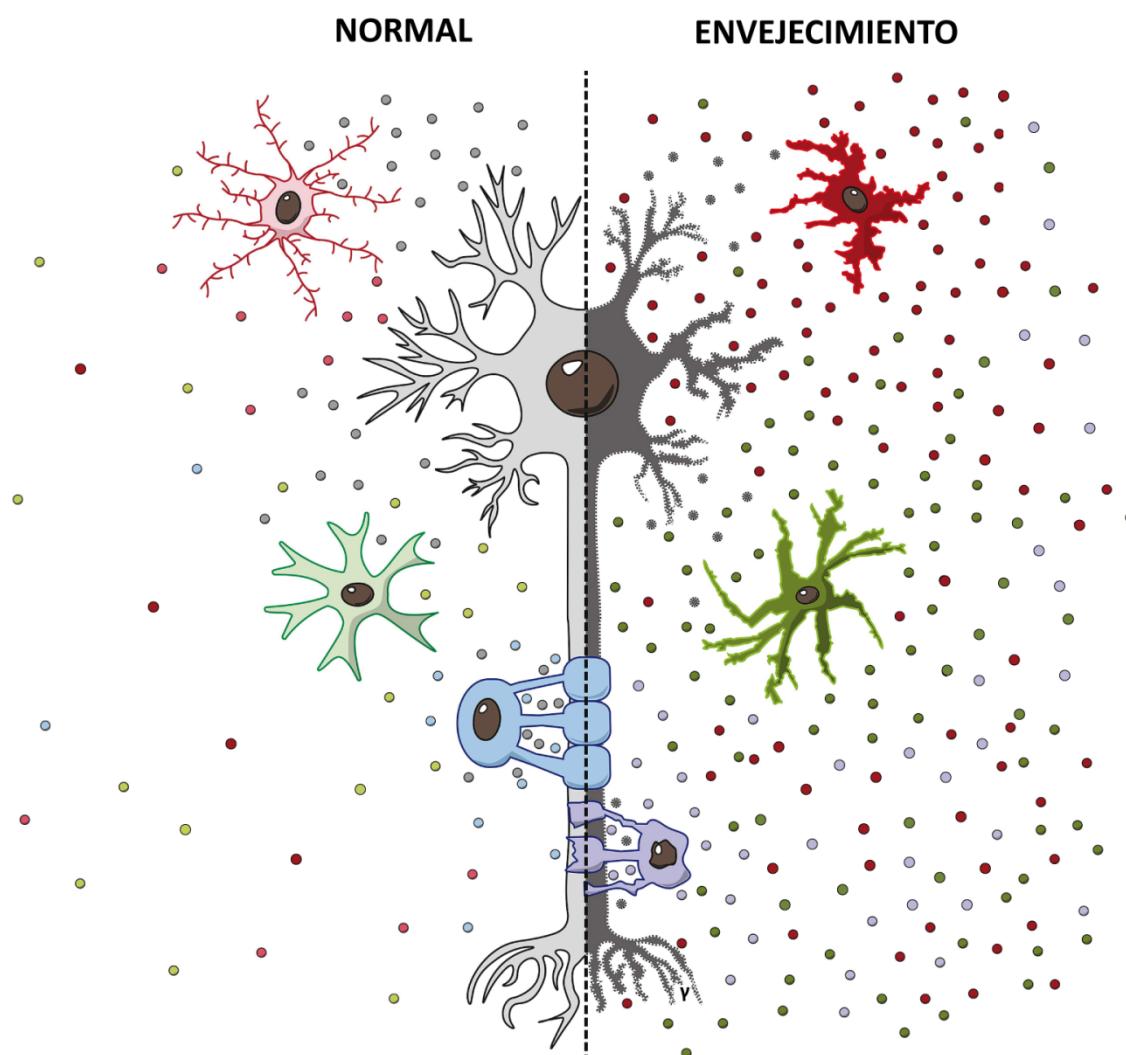


Figura 2. Alteraciones características del envejecimiento. El envejecimiento va asociado a numerosos cambios deletéreos, tanto en las células gliales como en las neuronas, que se van acumulando con el paso del tiempo y promueven neuroinflamación y deterioro cognitivo. Las células gliales presentan cambios en su morfología, aumentan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y, como consecuencia, alteraciones funcionales. Por otro lado, las neuronas muestran una disminución en la complejidad del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas que se asocian con pérdida sináptica. Imagen modificada de (Swenson et al., 2019).

1.2. Plasticidad sináptica

Durante el envejecimiento se produce una pérdida progresiva de la memoria y capacidad de aprendizaje debido al deterioro en la transmisión sináptica. Las sinapsis se clasifican según el tipo de neurotransmisor que media su actividad. Las sinapsis GABAérgicas responden a los neurotransmisores GABA o glicina (inhibitorias) (Turko et al., 2019), se encuentran mayoritariamente en la superficie de las dendritas y controlan la excitabilidad de las neuronas garantizando un equilibrio homeostático (Rozycka and Liguz-Leczmar, 2017). Las

sinapsis glutamatérgicas responden al neurotransmisor glutamato (excitatorias) y se localizan en las espinas dendríticas, ubicadas en la superficie de las dendritas. En la región más distal de las espinas se encuentra la densidad postsináptica (PSD), que es la estructura donde tiene lugar la transmisión sináptica. En las PSDs se acumulan los receptores de glutamato, principalmente NMDA (N-metil-D-Aspartato) o AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), proteínas de andamiaje y otras moléculas implicadas en las sinapsis (Sheng and Hoogenraad, 2007). Los cambios morfológicos en las espinas dendríticas correlacionan con la fuerza sináptica (van der Zee, 2015).

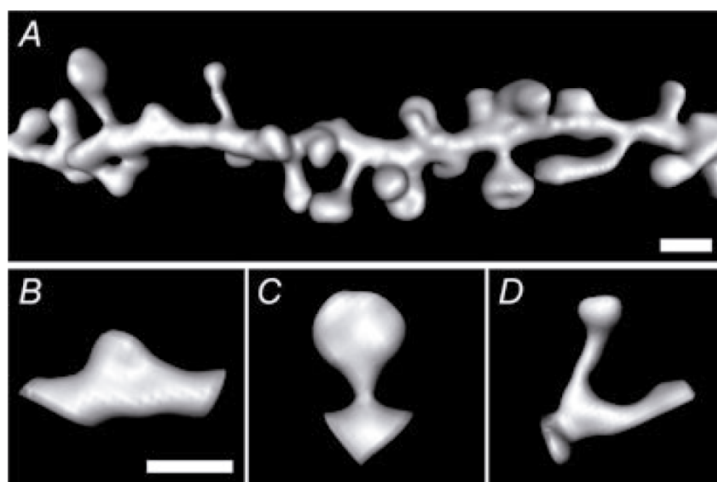


Figura 3. Diversidad morfológica de las espinas dendríticas. (a) Representación tridimensional de la reconstrucción de un segmento dendrítico de una neurona hipocámpal que expresa GFP, que permite la visualización de su morfología. Las espinas dendríticas se clasifican en tres tipos principales: *stubby* (b), *mushroom* (c) y *thin* (d). Imagen extraída de (McKinney, 2010).

Las espinas dendríticas pueden dividirse en tres tipos dependiendo de su morfología (Figura 3): *mushroom*, con forma de hongo presentan una cabeza voluminosa unida a la dendrita por un estrecho cuello; *stubby* son espinas gruesas y cortas que carecen de cuello; y *thin*, son delgadas y largas, apenas tienen cabeza (Hering and Sheng, 2001). Las espinas *mushroom* son las espinas más estables, se caracterizan por una PSD grande que les permite tener un mayor número de receptores AMPA, por lo que funcionalmente son más fuertes y duraderas. Las espinas *mushroom* se consideran responsables de la memoria a largo plazo. Por el contrario, las espinas *thin* son estructuras muy dinámicas que pueden aparecer o desaparecer rápidamente, así como agrandarse o encogerse dependiendo de la actividad sináptica. Poseen una PSD más pequeña caracterizada por la presencia mayoritaria de receptores NMDA y pocos receptores AMPA. Son las espinas más abundantes y, debido a su gran plasticidad, se considera que estas espinas son las encargadas del proceso de aprendizaje (van der Zee, 2015, Bourne and Harris, 2007).

La remodelación estructural o la aparición de nuevas espinas es dependiente de la plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTP) o la depresión a largo plazo (LTD). La LTP hace referencia al aumento en la comunicación sináptica entre dos neuronas, como consecuencia de una estimulación eléctrica normalmente de alta frecuencia. Este proceso es dependiente de los receptores NMDA para su inducción y de los receptores AMPA para su mantenimiento (Matsuzaki et al., 2004). La LTD es una estimulación de baja frecuencia que conlleva la eliminación de receptores AMPA de la sinapsis y finalmente la disminución a largo plazo de la transmisión sináptica entre dos neuronas (Malinow and Malenka, 2002).

Durante el envejecimiento se produce una perturbación en la función sináptica, contribuyendo al deterioro cognitivo. La densidad sináptica se estabiliza mediante un equilibrio homeostático gracias a la coordinación de los siguientes procesos: sinaptogénesis (capacidad de formación de nuevas espinas), poda sináptica (eliminación controlada y selectiva de las sinapsis más débiles o innecesarias;) y plasticidad de las espinas dendríticas que permite cambiar su morfología. La coordinación de estas funciones es lo que mantiene una correcta función sináptica y, por el contrario, su desregulación conduce a una disminución de las capacidades cerebrales (van der Zee, 2015).

El número de espinas dendríticas varía durante la vida del individuo. En estadios postnatales tempranos existe un exceso de espinas dendríticas. Las células gliales se encargan de remodelar las conexiones sinápticas eliminando las estructuras sinápticas menos estables mediante un proceso denominado poda sináptica (Paolicelli et al., 2011). Por el contrario, durante el envejecimiento se produce una disminución gradual en el número de espinas dendríticas y alteraciones en su morfología que, como consecuencia, da lugar a fallos en la plasticidad y transmisión sináptica (Penzes et al., 2011, Benavides-Piccione et al., 2013). Estudios previos han demostrado que las espinas *thin* son más vulnerables al envejecimiento, siendo su disminución mayor que las espinas *mushroom*. Además, las espinas *mushroom* presentan un aumento en el tamaño de las PSD, probablemente como medida compensatoria de la pérdida sináptica (Bloss et al., 2011, Dumitriu et al., 2010). Estos cambios morfológicos indican un desbalance entre las “espinas de memoria” y las “espinas de aprendizaje” que se traduciría en un fallo en la adquisición y almacenamiento de

nueva información. Por el contrario, la capacidad de recordar hechos del pasado quedaría prácticamente intacta.

Todos estos cambios conducen a un declive en la comunicación sináptica que causa un deterioro progresivo en la memoria y el aprendizaje relacionados con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas asociadas.

1.3. Senescencia

La senescencia celular es un proceso fisiológico asociado al envejecimiento, inducido por estímulos citotóxicos, como respuesta a señales de estrés, o por determinados oncogenes como Ras y Myc (Cohen and Torres, 2019). Este proceso se caracteriza por la detención irreversible de la proliferación celular debido al aumento de la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p16, cambios en la morfología celular y un incremento en los focos de heterocromatina, entre otros. Además, las células senescentes se caracterizan por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, proteasas y factores de crecimiento, que en su conjunto se denominan “SASP” (*Senescence Associated Secretory Phenotype*) (Gosselin and Rivest, 2018). La secreción de los SASP por parte de células senescentes genera, en su entorno tisular, un estado pro-inflamatorio que contribuye con la aceleración del envejecimiento (Cohen and Torres, 2019).

La senescencia normalmente tiene un papel fisiológico importante y representa un proceso de protección para los tejidos. Para ello, limita la replicación de células tumorales, promueve mecanismos de reparación de tejidos y participa en el mantenimiento de la homeostasis tisular. Las células senescentes son muy resistentes a la apoptosis, por lo que tienen que ser eliminadas por las células del sistema inmune. Sin embargo, como hemos visto anteriormente, durante el envejecimiento se produce una disminución en las funciones fagocíticas por lo que las células senescentes comienzan a acumularse de una forma muy significativa, lo que acaba teniendo efectos deletéreos (Gosselin and Rivest, 2018).

A pesar de que se ha encontrado un acúmulo de células senescentes en enfermedades cerebrales, nuestro conocimiento sobre su contribución al deterioro cognitivo aún es muy limitado (Baker and Petersen, 2018). Estudios muy recientes describen cómo la

presencia de células senescentes en el cerebro (microglia, astrocitos y progenitores de oligodendrocitos) contribuyen a la progresión de la degeneración de EA o la demencia fronto-temporal en modelos murinos de estas enfermedades. La eliminación de estas células, por el contrario previene la neuroinflamación y la pérdida de memoria asociada (Cohen and Torres, 2019, Kritsilis et al., 2018, Bussian et al., 2018, Zhang et al., 2019).

Uno de los factores producido por las células senescentes es la proteína *Secreted Frizzled Related Protein 1* (Sfrp1), que se considera SASP. Estudios realizados en cultivos de fibroblastos y células epiteliales humanas han demostrado que la proteína Sfrp1 es necesaria y suficiente para inducir senescencia (Elzi et al., 2012), por lo que alteraciones en su expresión durante el envejecimiento en el cerebro podrían contribuir con el deterioro de las funciones cognitivas.

2. Secreted Frizzled Related Protein 1

Las Secreted Frizzled Related Proteins (Sfrps) son una familia de proteínas secretables con 5 miembros en mamíferos (1-5), implicadas en la comunicación célula-célula durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en edad adulta (Bovolenta et al., 2008). Son proteínas altamente difusibles de 30-37 KDa que se identificaron de manera independiente en dos contextos diferentes, la gastrulación en *Xenopus* (Leyns et al., 1997) y en líneas celulares como moduladoras de la apoptosis (Melkonyan et al., 1997).

Estas proteínas están formadas por dos dominios de plegamiento independiente: en el extremo N-terminal contiene un péptido señal que permite su secreción, seguido de un dominio rico en cisteínas (CRD), contiene 10 cisteínas que forman 5 puentes disulfuro. Este dominio presenta una alta homología con la secuencia extracelular de las proteínas Frizzled, receptores de los ligandos Wnt (Hoang et al., 1996). El dominio C-terminal contiene un *Netrin-Related motif* (NTR). En la subfamilia formada por las proteínas Sfrp1/2/5, este dominio contiene en su secuencia seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro (Chong et al., 2002). Además, comparte similitudes conformacionales con proteínas que poseen diversas funciones como la Netrina1 (implicada en guía axonal), inhibidores de metaloproteasas (TIMP), proteínas potenciadoras de la proteinasa C

procolágeno tipo 1 (PCOLCE) y las proteínas de complemento C3, C4 y C5 (Banyai and Patthy, 1999).

Las proteínas Sfrps han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de modular las vías de Wnts, las cuales están implicadas en la regulación de diversos procesos durante el desarrollo embrionario, como proliferación y especificación celular; así como en el mantenimiento de la homeostasis tisular en adulto (Clevers and Nusse, 2012). Inicialmente las proteínas Sfrps fueron descritas como antagonistas de la vía de señalización Wnt, debido a su capacidad de unirse a las proteínas Wnt en el medio extracelular a través del dominio CRD, impidiendo la activación de la vía (Wang et al., 1997). Posteriormente, varios laboratorios, incluido el nuestro, demostraron que las proteínas Sfrps se unen a Wnts también por el dominio NTR (Uren et al., 2000, Lopez-Rios et al., 2008), pudiendo actuar no sólo como antagonistas sino también como moduladores positivos de la vía. En líneas celulares se ha demostrado que Sfrp actúan de forma bifásica sobre la vía Wnt/ β catenina, es decir, concentraciones bajas de Sfrps activan la vía y concentraciones altas la inhiben (Xavier et al., 2014). Sfrp1 funciona como una molécula de guía axonal para las células ganglionales de la retina y este efecto requiere la presencia del receptor Frizzled2 (Rodriguez et al., 2005). Además, se ha demostrado que Sfrp promueve la difusión de proteínas Wnt en distintos contextos celulares (Mii and Taira, 2009, Esteve et al., 2011b, Esteve et al., 2019a). Por lo tanto, las interacciones entre las moléculas Wnt, Sfrps y los receptores Fz modulan la señalización de la vía de Wnt tanto potenciándola como inhibiéndola (Figura 1 a-c).

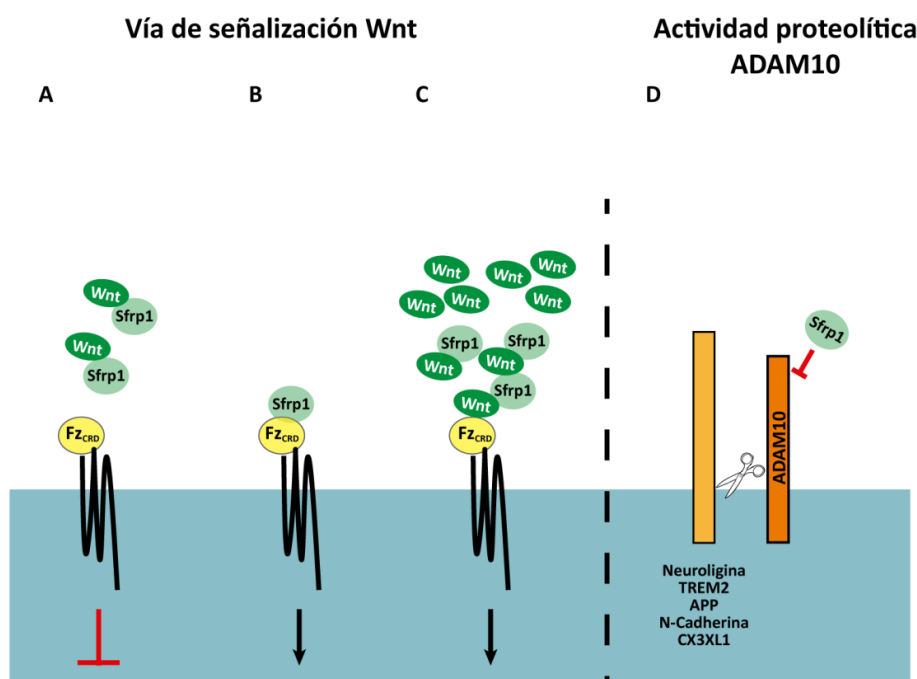


Figura 4. Sfrp1 es un regulador multifuncional de la comunicación celular. Representación de los distintos mecanismos mediante los cuales Sfrp1 regula el desarrollo y la homeostasis tisular. a) Sfrp1 actúa como antagonista de la vía de Wnt, inhibiendo la cascada de señalización mediante el secuestro de los ligandos. b) Sfrp1 promueve la señalización de Wnt mediante su interacción directa con el receptor Frizzled. c) SFRPs promueven la difusión de los ligandos Wnt. d) Sfrp1 se une y modula negativamente la actividad de la metaloproteasa ADAM10.

Las proteínas Sfrps también interaccionan con otras moléculas (Esteve and Bovolenta, 2010). Sfrp1 se une e inhibe la actividad de RANKL, un miembro de la familia de las proteínas TNFs (*Tumor Necrosis Factor*) involucradas en la formación de osteoclastos (Hausler et al., 2004). Sfrp2 se une a la metaloproteasa de la familia Tolloid y regula el procesamiento del procolágeno (Kobayashi et al., 2009) o puede interaccionar con el complejo de integrina-fibronectina, modulando la apoptosis celular (Lee et al., 2006).

Nuestro laboratorio ha demostrado que Sfrp1 también se une a la metaloproteasa ADAM10 (*A Disintegrin and Metalloprotease*) modulando negativamente su actividad proteolítica (Figura 4d). ADAM10 es una metaloproteasa transmembrana con función *sheddas*, es decir, proteoliza múltiples sustratos liberando el ectodominio al espacio extracelular. Sus sustratos están involucrados en funciones muy diversas como proliferación, adhesión celular, inflamación o plasticidad sináptica. Sfrp1 disminuye la actividad de ADAM10 interfiriendo en la proteólisis de sus sustratos entre ellos N-cadherina, L1 y Notch (Esteve et al., 2011a, Esteve et al., 2019a, Marcos et al., 2015). Uno de los sustratos de ADAM10 más estudiados es la proteína precursora de amiloide (APP), una de las proteínas involucradas en la patología Alzheimer. Nuestro laboratorio demostró que Sfrp1 interfiere en la proteólisis de APP mediada por ADAM10. En ratones nulos para *Sfrp1* la actividad de ADAM10 en cerebro está incrementada, y por el contrario la adición de Sfrp1 en líneas celulares provoca la inhibición parcial de la actividad proteolítica de esta metaloproteasa (Esteve et al., 2011a).

2.1. Sfrp1 durante el envejecimiento y otras patologías

La implicación de SFRP1 en tumorigénesis es una de sus funciones más estudiadas. Mutaciones o alteraciones en la expresión de componentes de la vía de Wnt/ β catenina, están implicados en tumorigénesis y metástasis (Klaus and Birchmeier, 2008). La supresión o disminución en la expresión de las proteínas Sfrp1 y Sfrp2, debido a la hipermetilación de

sus promotores, es un factor clave en la progresión de tumores (Caldwell et al., 2004, Lee et al., 2004).

La expresión de la proteína Sfrp1 también se encuentra alterada en otras patologías. Por ejemplo, se ha descrito un aumento en los niveles de expresión de SFRP1 en la retina de individuos que padecen retinitis pigmentosa (Hackam, 2005) o glaucoma (Wang et al., 2008). Los niveles de Sfrp1 también están aumentados en enfermedades asociadas a inflamación crónica, como pueden ser la periodontitis, la artrosis reumatoide o el enfisema pulmonar (Li and Amar, 2007, Walsh et al., 2009, Foronjy et al., 2010).

Sfrp1 se expresa abundantemente en el telencéfalo durante el desarrollo embrionario en ratón, donde participa en los procesos de neurogénesis y regionalización del cerebro (Trevant et al., 2008, Esteve et al., 2019a) y su expresión es baja en el cerebro adulto (Augustine et al., 2001). Sin embargo, estudios muy recientes han demostrado que los niveles de mRNA de *SFRP1* aumentan en la corteza prefrontal humana durante el envejecimiento (Folke et al., 2019). El incremento de los niveles de expresión de Sfrp1 durante el envejecimiento cerebral podría contribuir a su degeneración, ya que Sfrp1 es un inductor de senescencia celular (Elzi et al., 2012). En los últimos años, se ha demostrado cómo la senescencia contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como pueden ser la enfermedad de Parkinson, las taupatías o la EA (Gosselin and Rivest, 2018, Bussian et al., 2018, Zhang et al., 2019). Además, estudios de nuestro laboratorio demostraron que Sfrp1 es capaz de modular negativamente la actividad de ADAM10 en el SNC (Esteve et al., 2011a) y como consecuencia, el procesamiento de la proteína APP, proteína implicada en el desarrollo de la EA. Estos datos sugieren que, alteraciones en los niveles de Sfrp1 podrían estar relacionados con el desarrollo y/o progresión de la EA.

2.2. Papel de Sfrp1 en la enfermedad Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de memoria que, de forma progresiva, conduce a una profunda demencia (Selkoe and Hardy, 2016). La incidencia de la EA en la población es elevada, afectando al 5% de las personas

entre 60-65 años y entre un 25-50% de las personas mayores de 85 años. La etiología de la EA en un 2-5% de los casos es de origen genético, debido a mutaciones en los genes APP, PS1 y PS2 (Bertram et al., 2010) proteínas involucradas en la generación del péptido A β . Esta forma de la enfermedad es de inicio temprano, 40-55 años cursando de forma rápida y agresiva. Sin embargo, en el 95-98% de los casos restantes, la enfermedad se detecta a partir de los 65 años, su progresión es más lenta, su etiología es desconocida y es multifactorial. El factor de riesgo más importante de esta enfermedad es la edad y, en menor medida, la presencia de ciertas variantes de genes expresados en células gliales (APOE, TREM2, etc...). Además, otros factores de riesgo para la EA son la obesidad, la diabetes, la inflamación crónica de bajo grado, alteraciones vasculares y metabólicas (Masters et al., 2015).

A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la acumulación del péptido A β en forma de agregados extracelulares, llamados placas amiloides y por la presencia intraneuronal de ovillos fibrilares formados por la proteína tau hiper-fosforilada. Además, estas alteraciones van acompañadas por otros cambios, como la presencia de neuroinflamación y la pérdida de sinapsis (Selkoe and Hardy, 2016). La producción del péptido A β tiene lugar mayoritariamente en las neuronas y es el resultado del procesamiento secuencial de la proteína APP por la β -secretasa (BACE) y el complejo γ -secretasa (PS1, PS2, nicastrina y APh1). Este procesamiento se conoce como vía amiloidogénica, que conduce a un aumento en la producción de péptidos A β , los cuales agregan progresivamente formando las placas amiloides (Zhang et al., 2011, Haass and Selkoe, 2007). Sin embargo, la proteína APP se proteoliza de forma mayoritaria y en condiciones no patológicas por una vía alternativa, denominada vía no amiloidegénica. En este caso, APP es proteolizada por la α -secretasa ADAM10, la cual corta APP dentro de la secuencia A β evitando la generación de los péptidos A β tóxicos, liberando al medio extracelular un fragmento denominado sAPP α , al cual se le han atribuido funciones neuroprotectoras y neurotróficas (Ring et al., 2007). Ambas vías son excluyentes, ya que ADAM10 y BACE se encuentran en compartimentos celulares diferentes y compiten por proteolizar APP (Chia and Gleeson, 2011, Lichtenthaler, 2012). Por lo tanto, una disminución en la actividad proteolítica de ADAM10 conlleva un aumento en la proteólisis de APP por BACE y, como consecuencia, un aumento en la producción de los péptidos A β (Figura 5).

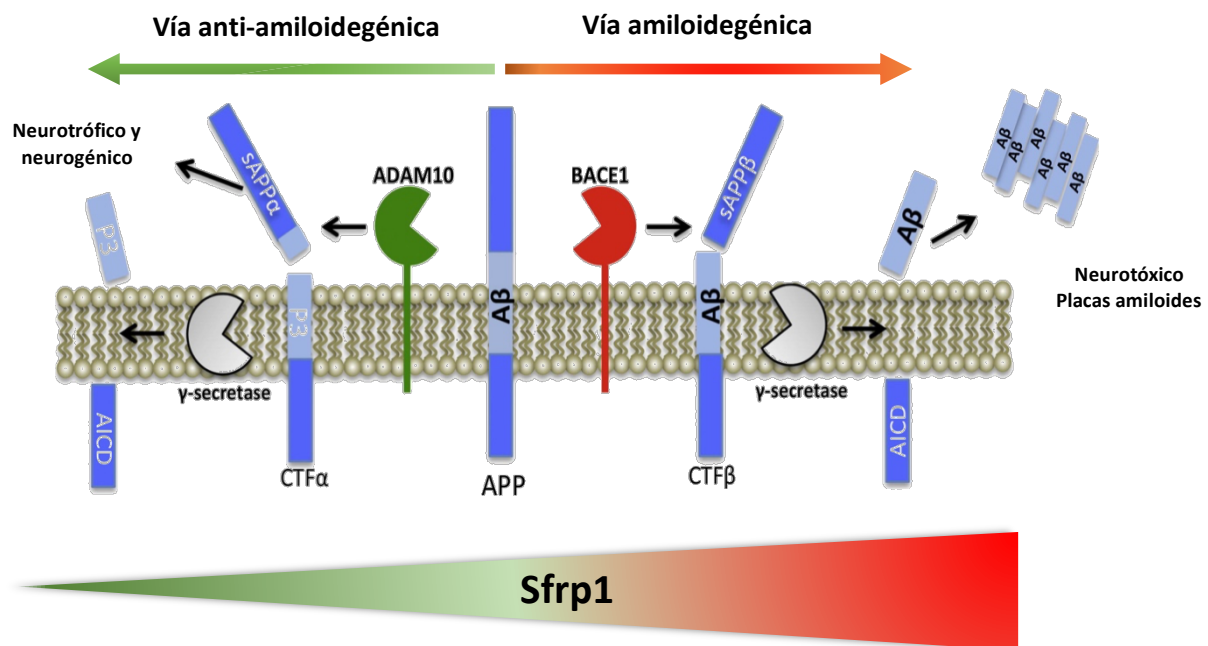


Figura 5. Esquema del procesamiento de la proteína APP. La proteína APP puede ser proteolizada de manera excluyente por dos vías: amiloidegénica o anti-amiloidegénica. A la izquierda mostramos el procesamiento anti-amiloidegénico, mediado por α -secretasa (ADAM10) y el complejo γ -secretasa liberando los fragmentos APPs α , AICD y P3. La vía amiloidegénica está caracterizada por el corte por β -secretasa (BACE1) y el complejo γ -secretasa liberando los fragmentos APPs β , AICD y los péptidos A β . Sfrp1 es un modulador negativo de ADAM10, por lo que a mayor concentración de Sfrp1 mayor es el procesamiento por la vía amiloidegénica y mayor es la liberación de péptidos A β . Imagen modificada de (Vassar, 2013).

Sfrp1 es una proteína que modula negativamente la actividad proteolítica de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). Además, los niveles de mRNA de *SFRP1* se encuentra aumentados significativamente en extractos cerebrales de personas mayores y en el hipocampo de pacientes con EA en estadios tempranos y avanzados de la enfermedad (Blalock et al., 2004, Folke et al., 2019, Esteve et al., 2019b). Estos datos sugieren que altos niveles de la proteína Sfrp1 podría contribuir al desarrollo y/o progresión de la EA. En apoyo a esta hipótesis, estudios recientes del laboratorio han demostrado que Sfrp1 se acumula en las placas amiloides, y es producida por células gliales (astrocitos y microglia). Además, pacientes de EA presentan altos niveles de la proteína en extractos cerebrales. Para analizar si *SFRP1* participa en la progresión de la EA se utilizó un modelo murino de amiloidogénesis (APP;PS1) el cual se cruzó con ratones nulos para *Sfrp1*, con el fin de obtener ratones APP;PS1;*Sfrp1*^{-/-}. Estos ratones presentaban niveles más elevados del fragmento sAPP α , una

reducción de péptidos A β y de placas amiloides, así como una disminución de la neuroinflamación asociada a las placas. Además, la disminución de Sfrp1, bien por inactivación génica o por la infusión de un anticuerpo neutralizante de la actividad de Sfrp1, previene la reducción de la LTP y la pérdida de memoria presente en ratones APP;PS1 (Esteve et al., 2019b) (Figura 6).

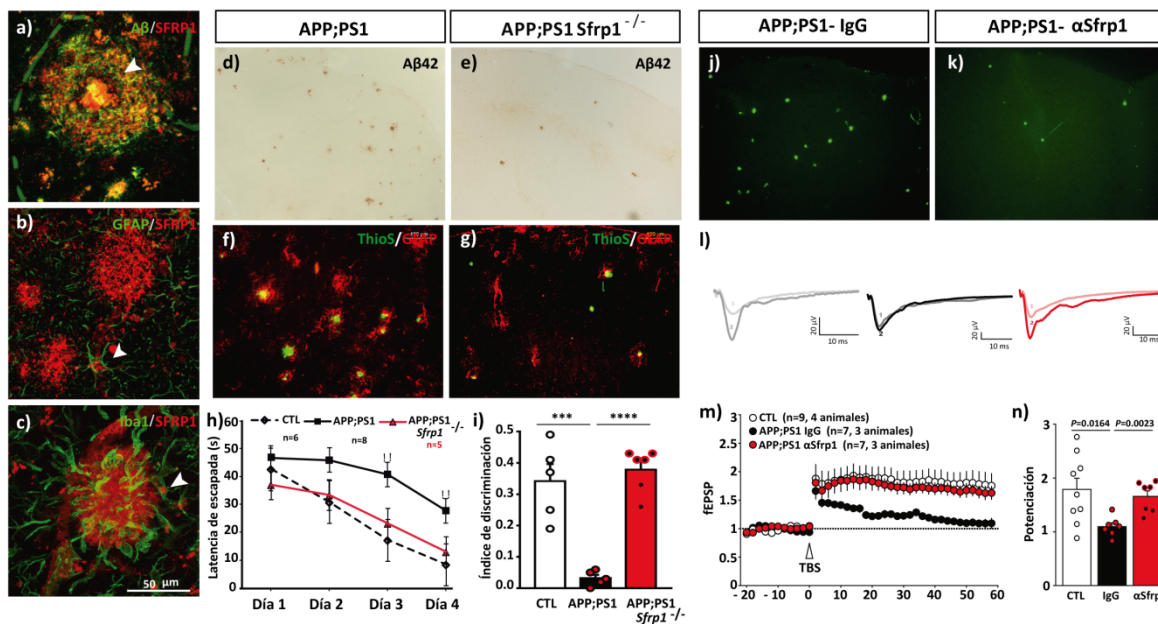


Figura 6. Implicación de la proteína Sfrp1 en la patología de la EA. Sfrp1 colocaliza con A β en las placas amiloides (a). Se expresa en microglía (Iba1) (b) y astrocitos (GFAP) (c) en la corteza cerebral de pacientes de EA. La inactivación genética de la proteína Sfrp1 en los ratones APP;PS1 disminuye significativamente el acúmulo de placas amiloides (d, e), la neuroinflamación asociada (f, g) y previene la pérdida cognitiva presente en el ratón. Además, la neutralización de la actividad de Sfrp1 con un anticuerpo específico anti-Sfrp1 es capaz de reducir los depósitos amiloides, así como prevenir la pérdida de LTP presente en el modelo APP;PS1. Estos resultados demuestran la implicación de Sfrp1 en la patología de Alzheimer (Esteve et al., 2019b).

La ausencia de pérdida de memoria en ratones APP;PS1;*Sfrp1*^{-/-} podría explicarse por un aumento en la actividad de ADAM10, ya que los datos de nuestro laboratorio demuestran una disminución en los niveles del péptido A β y en el número de placas amiloides. Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos dirigidos a neutralizar el péptido A β realizados en pacientes que sufren EA, no han tenido el éxito esperado. De hecho, a pesar de que alguno de estos tratamientos han conseguido disminuir el número y tamaño de placas amiloides, no han sido capaces de frenar el deterioro cognitivo que sufren los pacientes de EA (Sevigny et al., 2016, Godyn et al., 2016). Aunque existen varias explicaciones plausibles para este fracaso, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas implicadas en otros procesos

que también contribuyen a la progresión de la enfermedad es una buena estrategia a explorar.

En este contexto, es importante destacar que ADAM10 proteoliza sustratos implicados en neuroinflamación o plasticidad sináptica. Por ejemplo las proteínas TREM2 y CX3CL1 (Hundhausen et al., 2007, Kleinberger et al., 2014) que tienen una función muy importante en neuroinflamación; o las proteínas N-cadherina y neuroligina (Reiss et al., 2005, Suzuki et al., 2012, Saftig and Lichtenthaler, 2015) implicadas en plasticidad sináptica. De hecho, la inactivación génica de ADAM10 específicamente en neuronas postnatales induce astrogliosis y microgliosis asociado con alteraciones cognitivas (Prox et al., 2013).

Con estos precedentes, en esta tesis nos planteamos si Sfrp1, de forma independiente a su efecto sobre el procesamiento de APP, podría contribuir al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento o a la EA influyendo en otros procesos como la neuroinflamación y/o la pérdida de plasticidad sináptica.

OBJETIVOS

Sfrp1 es una proteína altamente difusible que actúa como regulador multifuncional en la comunicación célula-célula. Estudios recientes demuestran que los niveles de mRNA de *SFRP1* están incrementados en el cerebro humano durante el envejecimiento y la EA esporádica (Folke et al., 2019, Blalock et al., 2004, Esteve et al., 2019b). Como se detalla en la introducción, nuestro laboratorio ha demostrado que altos niveles de SFRP1 contribuyen a la patogénesis de la EA mediante la modulación negativa de la metaloproteasa ADAM10 (Esteve et al., 2011a, Esteve et al., 2019b). El trabajo desarrollado hasta ahora demuestra que, altos niveles de la proteína SFRP1 correlacionan con altos niveles del péptido A β en pacientes con EA. Estas observaciones serían, tal vez, suficientes para explicar cómo la inactivación génica de *Sfrp1* o la neutralización de su actividad con un anticuerpo específico, es suficiente para prevenir la neuroinflamación, la pérdida de plasticidad sináptica y el deterioro cognitivo asociado a la EA (Esteve et al., 2019b). Sin embargo, varios estudios clínicos han demostrado la ausencia de correlación entre placas amiloides y patología de la EA, sugiriendo la posible participación de SFRP1 en otros eventos implicados en la patogénesis de EA. De hecho, ADAM10 tienen múltiples sustratos conocidos, entre ellos proteínas implicadas en la activación de la respuesta de las células microgliales ante un estímulo inflamatorio o en proteínas implicadas en plasticidad sináptica.

Sobre esta base, formulamos la hipótesis de que altos niveles de SFRP1 podrían influir en la respuesta neuroinflamatoria y en la plasticidad sináptica, dos eventos implicados en el envejecimiento cerebral. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Generar y validar un modelo murino que sobre-exprese *Sfrp1* en cerebro.
2. Analizar las consecuencias morfológicas y funcionales de esta sobre-expresión.
3. Definir si alguno de los factores considerados de riesgo para el envejecimiento, aumentan el efecto de *Sfrp1* en cerebro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia (IF) y Western Blot (WB) se describen en la siguiente tabla (Tabla I). En los estudios de IF se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-conejo, anti-pollo y anti-cobaya conjugados con alexa 488, 555 o 647 a una dilución 1/1000. Para el marcaje de núcleos se utilizó Hoechst a una dilución 1/1000.

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Dilución IF	Dilución WB
Anti - Sfrp1	Ratón	Abcam	1:2000	1:500
Anti - β gal	Pollo	Abcam	1:2000	1:2000
Anti - GFAP	Conejo	Millipore	1:1000	
Anti - Iba1	Conejo	Wako	1:1000	
Anti - p38	Ratón	Cell Signaling		1:1000
Anti - pp38	Conejo	Cell Signaling		1:1000
Anti - Tau5	Ratón	Calbiochem		1:1000
Anti - pTau (PHF1) Serinas: S396/S404	Ratón	Cedido por el Dr. Jesús Ávila		1:1000
Anti - Bassoon	Ratón	Abcam	1:1000	
Anti - Homer	Conejo	Novus Biologicals	1:1000	
Anti - VGat	Cobaya	Synaptic System	1:1000	
Anti - Gephyrin	Ratón	Synaptic System	1:1000	
Anti - GAPDH	Ratón	Santa Cruz Biothecnology		1:1000
Anti - Vglut2	Cobaya	Millipore		1:500
Anti - Cd68	Ratón	Abcam		1:1000

Tabla 1: Anticuerpos y diluciones utilizadas en los ensayos de inmunofluorescencia (IF) y Western Blot (WB).

Para los ensayos de WB se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horsedish peroxidase*; peroxidasa de rábano) anti-ratón y anti-conejo a una dilución 1:250.000.

2. Muestras de pacientes

Las muestras de tejido cerebral de pacientes de la enfermedad Alzheimer (EA) y control fueron obtenidas del Instituto de Neuropatología HUB-ICO-IDIBELL. Los tejidos fueron rápidamente diseccionados entre 3 y 16 horas post-mortem y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Las muestras de pacientes EA se dividieron según la clasificación histopatológica *Braak and Braak* (BB); BB I-II/O-A; III-IV/O-C; BBV-VI/B-C (Braak and Braak, 1991, Braak et al., 2006). Los casos con neuropatologías combinadas fueron excluidos. Las muestras control no habían sufrido enfermedades neurológicas, psiquiátricas o enfermedades metabólicas y no presentaban anomalías en el examen neuropatológico.

Las muestras fueron homogeneizadas en tampón hipotónico (TBS) con inhibidores de proteasas (100 µl por 100 mg de tejido). Las muestras fueron congeladas en isopentano durante 1 minuto, y se descongelaron lentamente en hielo. Posteriormente fueron centrifugadas a 15.000 r.p.m durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble. El pellet fue homogenizado en tampón de lisis RIPA (NP40 1%, Deoxicolato de Sodio 0,5%, SDS 1% en PBS 1X e inhibidores de proteasas), sonificado y centrifugado a 15.000 r.p.m. El sobrenadante resultante correspondía a la fracción RIPA. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

3. Animales

3.1. Características y mantenimiento

El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la Comisión de Bioética del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO). Los animales se mantuvieron en el CBMSO, donde fueron criados y alimentados. Se mantuvieron en un ambiente con

temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas respectivamente. Se utilizaron tanto machos como hembras adultas, estabulados en grupos de 4 a 5 animales por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum*.

Para este estudio se generó un ratón doble transgénico Tet-OFF/Sfrp1 que sobre-expresaba Sfrp1 en el sistema nervioso. Estos ratones provienen de un cruce de dos ratones modificados genéticamente. El primer ratón expresa un trans-activador tetraciclina (tTA*M2) regulado por el promotor específico de la proteína del filamento intermedio glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), una proteína específica de astrocitos Tg(GFAP-tTA*M2). Este ratón fue cedido por el Dr. José Javier Lucas. El segundo expresa los genes Sfrp1 y LacZ bajo un elemento de respuesta a tetraciclina (TRE-Sfrp1) que nos proporcionó la Dra. Cécile Duppé. Cuando el transgen (Sfrp1-TRE-LacZ) y el trans-activador (GFAP-tTA) se expresan en el mismo ratón, Sfrp1 y β Gal comienzan a sintetizarse específicamente en astrocitos (GFAP-tTA/TRE-Sfrp1). La proteína Sfrp1 sobre-expresada en este ratón es bovina, la cual tiene una homología aminoacídica del 94% con la de ratón.

La línea GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 se mantuvo en heterocigosis para el trans-activador GFAP-tTA y en homocigosis y heterocigosis de forma independiente para TRE-Sfrp1. Como control se utilizaron ratones hermanos que no habían heredado el transactivador.

También se utilizó un modelo murino para la enfermedad Alzheimer, APP;PS1 generado por (Jankowsky et al., 2004). La colonia utilizada se generó de ratones cedidos amablemente por el Dr. Torres-Alemán. Este ratón doble transgénico sobre-expresa, bajo el promotor PrP, el alelo APP humano que porta la llamada mutación sueca (K594M/n595L) y un alelo de la presinilina 1 humano (PSEN1) con una delación en el exón 9.

3.2. Administración comida alta en grasa

Se administró comida alta en grasa (DIO12492) la cual contiene 20% Kcal de proteínas, 20% Kcal de carbohidratos y un 60% kcal de grasa. Esta dieta se empezó a administrar a ratones controles y ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 6 meses de edad. Los ratones se sacrificaron 22 semanas más tarde. En paralelo se llevó otro grupo de animales

control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 con comida de uso común (Rodent Maintenance Diet) la cual contiene 20% Kcal de proteínas, 67% Kcal de carbohidratos y un 20% Kcal de grasa.

- Medición de glucosa en sangre

Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 10 horas antes de la medición de glucosa. Se extrajo una gota de sangre de la cola y se midió la concentración (mg/dL) utilizando el equipo One Touch Ultra (Life Scan).

3.3. Genotipado mediante PCR

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo ADN genómico derivado de una pequeña porción de cola digerida con tampón de lisis (1,25M NaOH, 10mM EDTA) durante una hora a 98°C. La reacción se paró con un tampón de neutralización (2M Tris-HCl).

Posteriormente, el genotipado se llevó a cabo con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta se realizó con una mezcla de Taq Polimerasa 2X (Supreme Master Mix, nzytech), Dimetilsulfóxido (DMSO), Oligonucleótido sentido, oligonucleótido antisentido y 0,6 µl de DNA, en un volumen final de 15 µl. Incluimos GAPDH como control de carga para diferenciar entre ratones homocigotos y heterocigotos. Los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en geles de 2%.

GEN	Oligo sentido	Oligo antisentido
Sfrp1bov	TGTGTCCTCCATGTGACAA	TGAGATGAGTTTTGTTCG
tTa	CGAAATCGTCTAGCGCGTC	ACTAAGTCATCGCGATGGA
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1

3.4. Extracción líquido cefalorraquídeo, sacrificio de ratones y disección del tejido

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal con dosis letales de Ketamina y Xilacina. A continuación, el líquido cefalorraquídeo y los tejidos fueron

obtenidos de la siguiente forma:

a) Extracción Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

El LCR fue extraído de ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 entre 8-10 meses de edad utilizando jeringuillas de heparina para penetrar hasta la cisterna magna y aspirando con cuidado de no contaminar la muestra con sangre. Posteriormente el LCR extraído se diluyó 1:1 con PBS e inhibidores de proteasas (Roche). Los LCR turbios o contaminados con sangre fueron excluidos del análisis.

b) Preparación de tejidos para análisis bioquímicos

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se diseccionó el cerebro. Se homogenizó medio hemisferio o el hipocampo en tampón RIPA con inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche). Posteriormente se centrifugaron los extractos durante 30 minutos a 4°C a 15000 r.p.m. Se determinó la concentración de proteica de los sobrenadantes con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

c) Preparación de tejido para inmunofluorescencia

Los ratones fueron transcárdialmente perfundidos con 30 ml de tampón salino (NaCl 0,9%) y 20 ml de 4% paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato 0,1M (wt/vol). Se diseccionaron los cerebros y se post-fijaron durante una noche. Al día siguiente se lavaron durante 24 horas con PBS y se cambiaron a una solución crioprotectora de 30% sacarosa en tampón fosfato. A continuación, el tejido se incluyó en una solución de 7,5% gelatina en 15% sacarosa durante 30 minutos. Los bloques fueron congelados con isopentano para la posterior obtención de secciones coronales del tejido de 15 ó 50 µm de grosor utilizando un criostato (Leica).

4. Inyecciones estereotáxicas de Sindbi virus

Se realizaron inyecciones de *Sindbi* virus que expresan la *Green Fluorescent Protein* (GFP), en la región de giro dentado (GD) del hipocampo en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos de 2 y 10 meses de edad. Estos virus fueron cedidos amablemente por el

Dr. José Antonio Esteban.

Los ratones fueron anestesiados mediante la aplicación inhalatoria de isoflurano (Forane, AbbVie Farmacéutica). El flujo de oxígeno fue de 250 ml/min y el isoflurano se aplicó al 4% durante la inducción y al 2% durante el mantenimiento. Una vez dormidos, los animales se colocaron en un estereotáxico específico de ratón (Stoelting) y se colocaron de manera que el cráneo quedara plano. Utilizando un bisturí estéril se realizó una incisión en la piel de la cabeza dejando accesible el cráneo. Se aplicó H₂O₂ para desinfectar la zona y poder visualizar correctamente Bregma. La craneotomía se realizó en un punto preciso utilizando agujas romas de 23G para permitir la inyección en las coordenadas estereotáficas (AP: 1,8; L: 1,5; DV: 2,2) tomando Bregma como punto de referencia. Todas las inyecciones se realizaron en el GD del hipocampo. La infusión se realizó con un inyector estereotáxico (Stoelting) a una velocidad de 0,2 µl/min, inyectando un volumen total de 1 µl de virus. La aguja se mantuvo en la misma posición durante 5 minutos después de la inyección y se extrajo lentamente. Transcurridas 15 horas de la inyección, los ratones fueron sacrificados y se procesaron para su posterior análisis por inmunofluorescencia.

5. Inmunofluorescencia

Las secciones se descongelaron y se hidrataron con PBS 1X. Posteriormente la peroxidasa endógena fue bloqueada con metanol y 3% H₂O₂ durante 10 minutos. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 0,1% Triton X-100 (PBST). Bloqueamos las secciones con tampón de bloqueo (PBST, 5% FBS, 1% BSA) durante al menos una hora. Los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo durante una noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBST y las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos 1/1000 en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (Sigma Aldrich) durante 5 minutos.

Las preparaciones fueron analizadas con el microscopio DMCR5000 equipado con una cámara monocroma DF350Fx (LEICA Microsystems), un microscopio de barrido láser

confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) o un microscopio de barrido láser confocal LSM800 acoplado a un microscopio invertido Axio Observer (Zeiss).

5.1. Análisis del número de sinapsis

Se cuantificó el número de sinapsis en cortes de 50 μm de grosor en la región CA1 del hipocampo. Las sinapsis excitatorias se analizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos: anti-Basson (pre-sináptico) y anti-Homer (post-sináptico) y las sinapsis inhibitorias utilizando anticuerpos anti-Gephyrin (pre-sináptico) y anti-VGat (post-sináptico). Se tomaron imágenes en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) y un objetivo del 63X con un zoom de 1,3. Fueron analizadas al menos 3 fotos de cada sección en al menos 3 secciones por ratón. Se tomaron imágenes de 4 ratones control y 2 ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Las imágenes fueron analizadas utilizando un software específico, *Volocity*, según se describe en (McLeod et al., 2017). El número y volumen de los botones sinápticos fueron analizados utilizando un protocolo optimizado del software para cada marcador. Las sinapsis se definen como la colocación entre los marcadores pre- y post-sinápticos. El software identifica la colocación de los marcadores pre-sinápticos y post-sinápticos como la superposición de 1 pixel o más en un solo plano. Los resultados se representaron como el porcentaje de sinapsis respecto al control.

5.2. Análisis morfológico de las neuronas

El análisis morfológico de las neuronas granulares del giro dentado (GD) del hipocampo se llevó a cabo en neuronas individuales infectadas con Sindbis virus. Se analizaron neuronas de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 10 meses. La fluorescencia de GFP permite la visualización de la morfología completa de la neurona sin necesidad de amplificar la señal. Para el análisis morfológico se seleccionó un mínimo de 25 neuronas aleatorias de cada genotipo. Las neuronas fueron reconstruidas utilizando un objetivo 25X de un microscopio de barrido láser confocal LSM800 acoplado a un microscopio invertido Axio Observer (Zeiss). El conjunto de imágenes en Z stacks recoge la neurona completa. Se tomaron imágenes de 3 ratones control y 4 ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. A

partir de estas imágenes, el análisis de la arborización y longitud dendrítica se realizó con el *plugging Simple Neurite Tracer* del software Fiji. Este *plugging* nos permitió realizar el análisis de *Sholl*, que cuantifica las intersecciones de las dendritas con círculos concéntricos a partir del soma separados entre sí por 10 μm . Los resultados fueron agrupados en tramos de 50 μm .

5.3. Análisis de las espinas dendríticas

El análisis de las espinas dendríticas se realizó en un mínimo de 25 segmentos dendríticos aleatorios por genotipo. Las neuronas fueron reconstruidas utilizando un objetivo del 63X y un zoom de 3X en un microscopio de barrido láser confocal LSM 800 acoplado a un microscopio invertido Axio Observer (Zeiss). El conjunto de imágenes en Z stacks recoge el segmento dendrítico completo. Se tomaron imágenes de 3 ratones control y 4 ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Posteriormente las imágenes fueron deconvolucionadas utilizando el software *Huygens* 18.1.p1. Para el análisis del número y la forma de las espinas se utilizó el software *NeuronStudio*, el cual es capaz de contar el número de espinas y clasificarlas en una de las tres categorías: hongo “*mushroom*”, delgadas “*thin*” y en forma de copa “*stubby*”. El software *NeuronStudio* clasifica las espinas de acuerdo con su relación entre el diámetro de la cabeza y cuello, la relación entre la longitud y el diámetro de la cabeza y finalmente, el diámetro de la cabeza. Los valores aplicados durante el estudio fueron los siguientes: relación de cuello (relación entre diámetro de la cabeza y cuello) 0,900; relación de la longitud (relación entre la longitud y el diámetro de la cabeza) 3.000 y el tamaño de la cabeza (diámetro de la cabeza) 0,700. Cada espina fue revisada manualmente para asegurar la veracidad de los resultados. Además, el software también calcula el diámetro de la cabeza de cada espina y la longitud de la espina MAX-DTS (la distancia desde un extremo de la espina hasta la superficie).

5.4. Análisis fagocitosis de terminales sinápticos

El análisis de la poda sináptica se llevó a cabo en cortes coronales de 50 μm con anticuerpos anti-Iba1 (marcador microglia), anti-CD68 (marcador de lisosomas) y anti-Vglut2 (marcador pre-sináptico). La microglia fue reconstruida utilizando un objetivo del 63X en un microscopio de barrido láser confocal LSM 710 acoplado a un microscopio vertical

Axiolmager. M2 (Zeiss). El conjunto de imágenes en Z stacks recogía la célula microglial completa. Se tomaron imágenes de 4 ratones control y 3 ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Se analizaron 5 células por animal como se describe en (Schafer et al., 2014) utilizando el software *Imaris*. Los datos se obtuvieron calculando el porcentaje de fagocitosis sináptica respecto al control (volumen Vglut2 envuelto/volumen de la célula *100).

6. Western Blot

Los extractos proteicos procedentes del tejido cerebral fueron diluidos a la misma concentración y se hirvieron durante 5 minutos a 98°C en tampón Laemili 5X (Glicerina 50%, azul de bromofenol y *β*-mercaptoetanol 10% en TrisHCl 20 mM pH 6,8). Las proteínas fueron separadas en geles de proliacridamina en presencia de SDS (al 8%, 10% o 15% dependiendo del peso molecular de las proteínas). Posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa a amperaje constante (300 mA) durante 75 minutos. Para comprobar la eficacia de la transferencia se tiñeron las membranas con Rojo Poceau.

Posteriormente se destiñeron las membranas con un lavado de TBS (NaCl 150 Mm, TrisHCl 10 M pH 8) 0,1% Tween20 (TBST) y las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% durante, al menos, una hora. Después se incubó la membrana, durante una noche a 4°C en agitación, con el anticuerpo primario diluido en TBST.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST y las membranas fueron incubadas durante una hora con los anticuerpos secundarios acoplados a POD , diluidos en leche al 5%. Las membranas se lavaron 2 veces con TBST y una vez más con TBS antes de su visualización con el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System) de Amersham y el ImageQuant Amersham 680. La cuantificación de las bandas obtenidas se llevó a cabo con el software Quantity One (BioRad).

6.1. Preparación de sinaptosomas y co-inmunoprecipitación

Para la preparación de sinaptosomas se utilizó el kit Syn-Per Synaptic Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se homogenizó en hielo un hemisferio cerebral procedente de ratones control y ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 de 10 meses en 10 ml de tampón Syn-Per Reagent con inhibidores de proteasas por gramo de tejido. Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C a 1200 x g. Se recogió el sobrenadante y se volvieron a centrifugar las muestras durante 20 minutos, 4 °C a 15.000 x g. El sobrenadante fue descartado y se añadió 2 ml de tampón Syn-Per Reagent por gramo de muestra.

Se separaron 100 µl de sinaptosomas por cada condición añadiéndoles detergentes (Tritón, Tween20 y SDS 10%). Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en rotación con 10 µg de anticuerpo (anti-Sfrp1 o anti-IgG1) y 100 µl de microesferas de proteína G-agarosa. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de las microesferas con TBS y se resuspendió en Lamelli Buffer 2X, desnaturalizándose a 100°C durante 5 minutos. A partir de este momento se continúa con el protocolo de Western Blot.

7. Pruebas de comportamiento

Para estudiar las posibles implicaciones conductuales de la sobre-expresión de Sfrp1 en el cerebro, se realizaron diferentes pruebas comportamentales relacionadas con la correcta coordinación motora, comportamiento social y memoria. Las pruebas se realizaron la misma sala de comportamiento, donde los animales fueron introducidos una semana antes de la realización de las pruebas para su habituación. Se realizaron siempre en las horas de luz, entre las 15:00 y las 19:00h. Todos los test se realizaron con ratones machos, a excepción del Rotarod y el Y-maze que se realizaron tanto en machos como en hembras. Las pruebas fueron analizadas manualmente y con el software Any-maze, de donde se extrajeron gráficos representativos del movimiento.

7.1. Rotarod

Es un test utilizado para evaluar la coordinación motora de los ratones (Jones and Roberts, 1968). El test se realizó durante tres días consecutivos utilizando el Mouse Rota-rod (Ugo Basile). Cada ratón fue entrenado durante dos días: durante el primer día los ratones fueron sometidos a 4 sesiones de 1 minuto de duración a una velocidad fija de 4 r.p.m, con intervalos de una hora entre las sesiones; el segundo día se aumentó el tiempo a 2 minutos

de duración con una aceleración de 4 r.p.m a 8 r.p.m. El tercer día los ratones realizaron el test que tuvo una duraración de 5 minutos con una aceleración de 4 r.p.m a 40 r.p.m y 4 sesiones con una hora de descanso al terminar cada sesión. Se representó la media del tiempo de las 4 sesiones, que los ratones eran capaces de mantenerse encima del equipo.

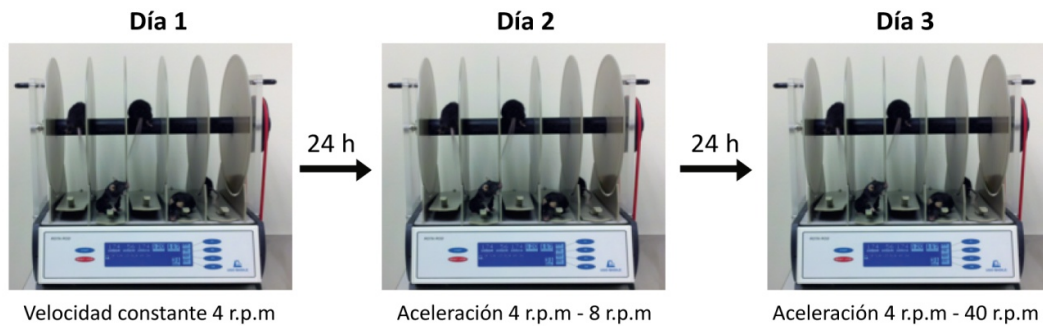


Figura 7. Prueba de coordinación motora Rotarod. Esquema sobre el test Rotarod durante los 3 días de la prueba.

7.2. Test de sociabilidad

Este test se utiliza para analizar el comportamiento social en ratones midiendo la tendencia del ratón a acercarse a otro ratón, lo que indica el grado de su sociabilidad (Crawley, 2004). Los ratones fueron expuestos a la interacción social (jaula con ratón desconocido) frente a la interacción inanimada con la jaula vacía. Este test se realiza en dos días consecutivos. El primer día consiste en la habituación del ratón a la caja durante 10 minutos. Durante el segundo día, la caja contiene dos jaulas que permiten el contacto visual, olfativo, auditivo y táctil; una de ellas estará vacía (interacción inanimada) y la otra tendrá en un interior un ratón desconocido que no había tenido contacto previo con el ratón sujeto (interacción social). Los ratones sujetos se colocaron en el centro de la caja, y se analiza su preferencia hacia la jaula vacía o a la jaula con un ratón durante 10 minutos. Se representa el tiempo que cada ratón invierte en cada jaula.

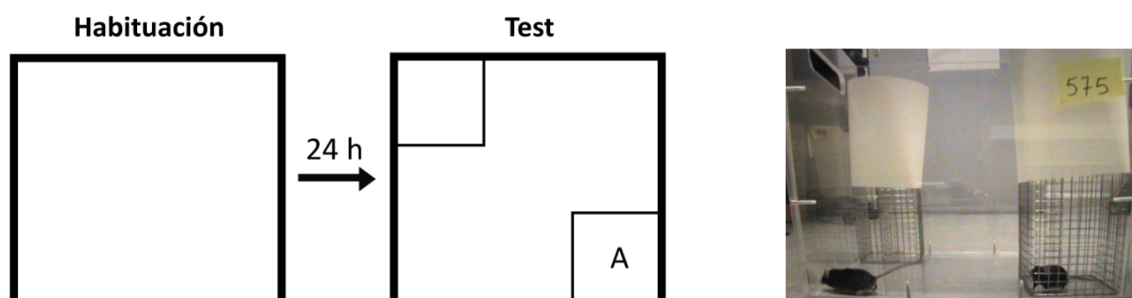


Figura 8. Prueba socialización. Esquema representativo de la habituación y del test de sociabilidad. Los cuadros hacen referencia a la posición de las jaulas, una de ellas vacía y otra (A) con un ratón desconocido.

7.3. Test de laberinto en cruz elevado (*Elevated Plus Maze*)

Este test se utiliza para analizar el comportamiento de “ansiedad” que presentan los animales (Pellow and File, 1986). El test se basa en la repulsión de los ratones a ambientes abiertos y elevados. Se coloca al ratón en un aparato con 4 brazos, dos de ellos cerrados (con paredes opacas) y dos abiertos (sin paredes) en forma de cruz que se encuentran a 45 cm de altura. Durante la duración del test, 5 minutos, se midió el tiempo que cada ratón pasaba en los brazos cerrados y abiertos (cuanto más ansiosos sean menos se atreverán a salir de los brazos cerrados que es su zona de confort). Se representó el índice de exploración en porcentaje (tiempo que los ratones invierten en los brazos abiertos respecto el tiempo de exploración total del brazo abierto y cerrado).

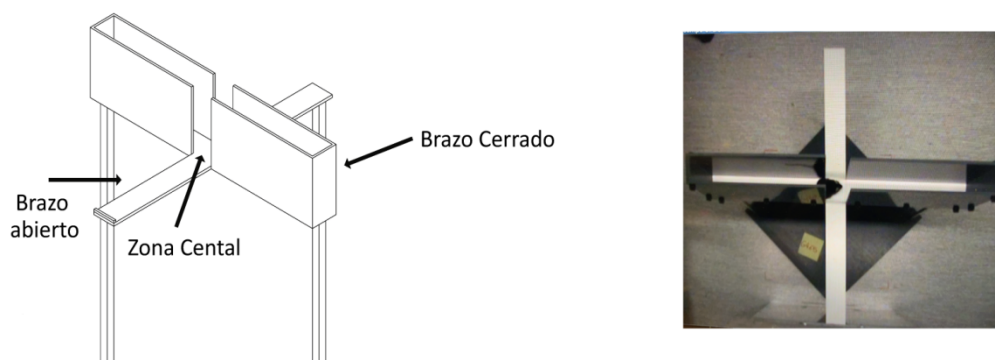


Figura 9. Prueba de comportamiento *Elevated Plus Maze*. En el panel de la izquierda se representa un esquema del laberinto en cruz elevado. A la derecha se muestra una imagen de un ratón durante el desarrollo del test.

7.4. Prueba de la Y (Y-maze)

El Y-maze es una prueba de comportamiento que evalúa la memoria espacial dependiente de hipocampo, aprovechando la preferencia innata de los ratones a explorar nuevos ambientes (Kraeuter et al., 2019, Dellu et al., 1997). Se utilizó una estructura con tres brazos idénticos en forma de Y con paredes opacas de 8 cm de altura. Se colocaron dos objetos diferentes a 20 cm de distancia y 40 cm de altura para que los ratones tuvieran dos puntos de referencia. Durante el entrenamiento, se dispuso al ratón sujeto dentro de la estructura y se le permitió explorar dos de los tres brazos (el tercer brazo estaría cerrado)

del aparato durante 7 minutos. El test se realizó una hora más tarde, colocando al ratón en el aparato de nuevo, pero esta vez siendo libre para explorar los tres brazos durante 5 minutos. Se cuantificó el tiempo que los ratones pasaban explorando los tres brazos, mostrando el porcentaje del tiempo que el ratón invierte explorando el brazo nuevo respecto al tiempo total de exploración (% Tiempo brazo derecho).

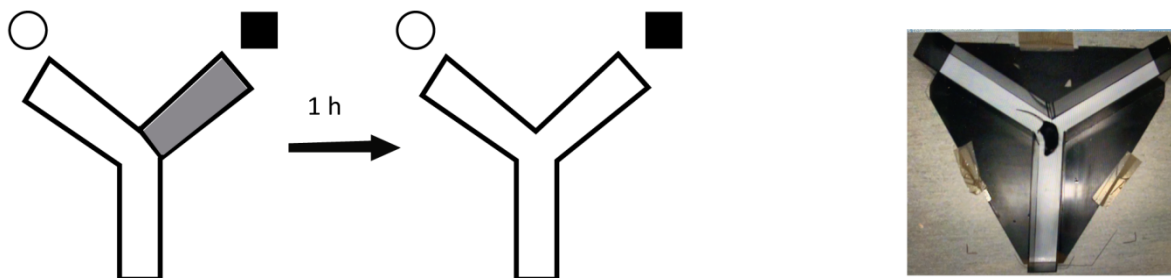


Figura 10. Prueba de aprendizaje y memoria Y-MAZE. A la izquierda se representa un esquema del entrenamiento y el test. El brazo de color gris hace referencia al brazo cerrado durante el entrenamiento. A la derecha se muestra una imagen de un ratón durante la prueba.

7.5. Test de discriminación de patrones (*Novel object localation test*)

Este test se utiliza para estudiar la memoria espacial de los ratones dependiente de una correcta función del hipocampo (Assini et al., 2009). Se realizó durante 2 días consecutivos en una caja de metacrilato de 41x41cm. Cada día el ratón es libre de explorar el ambiente durante 10 minutos. El primer día el ratón explora la caja vacía para que habituar al nuevo espacio. El segundo día se introdujeron dos objetos iguales en posiciones simétricas dentro de caja. Una hora más tarde, uno de los objetos se cambió de posición mientras el otro se mantuvo en la misma posición. El objetivo del test es saber si los ratones son capaces de reconocer que la posición de uno de los objetos ha cambiado. Para ello, se cuantificó el tiempo que los ratones pasan explorando el objeto en la nueva posición respecto al tiempo total de exploración expresando en porcentaje (% índice de memoria).

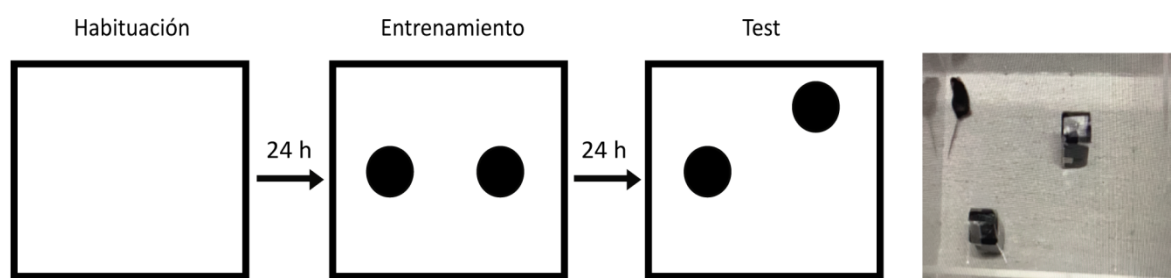


Figura 11. Prueba de aprendizaje y memoria *Novel object localization*. A la izquierda se representa un esquema sobre la realización del entrenamiento y el test. Los puntos negros representan la posición de los objetos en la caja en el transcurso de la prueba. A la derecha se muestra una imagen del ratón durante el desarrollo del test.

7.6. Test de reconocimiento de objetos (*Object recognition test*)

Este test se basa en la preferencia de los ratones para explorar nuevos objetos e implica la actividad de la corteza frontal y del hipocampo (Ennaceur and Delacour, 1988, Lueptow, 2017). Se realiza durante 3 días consecutivos, y cada día el ratón es libre de explorar durante 10 minutos. El primer día el ratón investiga una caja de metacrilado de 41x41cm vacía. El segundo día se introducen 2 objetos exactamente iguales en el centro de la caja equidistantes. El tercer día, se cambia uno de los objetos, el cual tiene una forma, color y textura totalmente diferente. Posteriormente se cuantificó el tiempo que el ratón invierte en explorar el nuevo objeto respecto al tiempo total de exploración, representado en porcentaje (% índice de memoria).

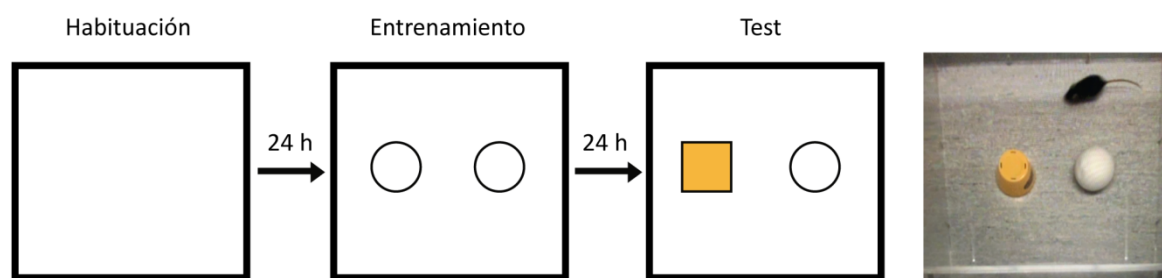


Figura 12. Prueba de aprendizaje y memoria de Reconocimiento de Objetos. A la izquierda se representa un esquema sobre la realización el entrenamiento y el test. Los puntos representan la posición esquemática de los objetos en la caja a lo largo de la prueba. A la derecha se muestra una imagen del ratón durante el desarrollo del test.

7.7. Test de miedo condicionado (*Contextual Fear conditioning*)

Este test consiste en el clásico condicionamiento de “Pauloian”, asociado al aprendizaje dependiente de hipocampo y amígdala (Pape and Pare, 2010, Assini et al., 2009). Los animales aprenden a asociar un ambiente con un estímulo aversivo como es un shock eléctrico. Este test tiene una duración de dos días, el primer día se realiza el condicionamiento, introduciendo al ratón en una caja (30x37x25 cm) durante 7,5 minutos. Durante 150 segundos el ratón explora libremente la caja, posteriormente recibe una descarga eléctrica de 0,8 mA cada 60 segundos contabilizando un total de 5 descargas. Al día

siguiente el ratón se colocó de nuevo en la misma caja, pero esta vez sin descargas eléctricas. Si los ratones son capaces de recordar las descargas eléctricas que recibieron en esa misma caja el día anterior presentarán una respuesta de miedo paralizándose, por el contrario, si los ratones no recuerdan la descarga eléctrica se moverán libremente por la caja. El comportamiento se analizó clasificando el movimiento como activo o paralizado, considerando como parálisis la inmovilidad completa del ratón a excepción del movimiento necesario para la respiración.

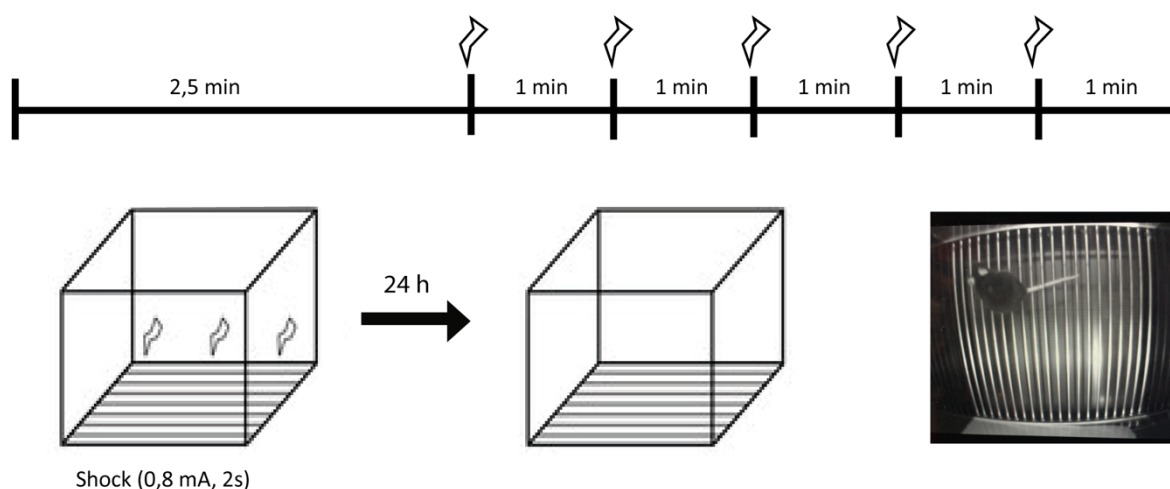


Figura 13. Prueba de aprendizaje y memoria *Contextual Fear Conditioning*. Esquema representativo sobre las descargas eléctricas sufridas por el ratón durante el entrenamiento. A la derecha se muestra una imagen del ratón durante el desarrollo del test.

8. Ensayos de ELISA tipo sandwich

ELISA para Sfrp1: se desarrolló un ELISA para la cuantificación de los niveles de Sfrp1 en extractos cerebrales humanos y de ratón, así como líquido cefalorraquídeo. Se incubó una placa de 96 pocillos (Nunc) durante una noche a 4°C con 50 µl/pocillo de una solución de anticuerpo anti-SFRP1 (isotipo IgG1) a 1,5 µg/ml en PBS 1X. Al día siguiente las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween20 al 0,05% (PBST) y se bloquearon durante 3 horas con BSA 2% en PBST a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se incubaron 2 horas a 37°C con 40 µl/pocillo de muestra. Los tejidos humanos se incubaron a una concentración 10 µg/pocillo; el tejido de ratón 5 µg/pocillo y líquido cefalorraquídeo a una dilución 1:20. Se realizaron 3 lavados con PBST y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C con 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-SFRP1 (IgG2B) marcado con biotina a 0,1 µg/ml como anticuerpo de captura.

Se volvieron a lavar las placas con PBST y se incubó durante 1 hora a 28°C con 50 µl/pocillo de estreptavidina-POD diluido 1:25.000 (Jackson Lab). Después del último lavado con PBST la reacción enzimática se desarrolló a 28°C en oscuridad durante aproximadamente 20 minutos utilizando 100 µl/pocillo de tetra-metil-bendidina (TMB, Sigma Aldrich). Paramos la reacción mediante la adicción de 100 µl/pocillo de ácido clorhídrico (2N HCl). Se midió la absorbancia placa a 450 nm en un fluorímetro, FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH).

ELISAS de citoquinas: se utilizaron ELISAs comerciales para las citoquinas IL6 (AB100713), IL1 β (ab100705) y TNF α (ab100747) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron 200 µg/pocillo de extractos cerebrales de ratón.

9. qRT-PCR

La corteza de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 10 meses de edad fueron diseccionadas y se extrajo RNA con Trizol (Life technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente el RNA fue extraído utilizando el kit RNeasy Lipid Mini Kit (Quiagen) según indica el fabricante. La concentración del RNA obtenida se midió a 260 nm de absorbancia utilizando el espectrómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). La retro-transcripción se realizó utilizando la misma concentración de RNA de todas las muestras, con el kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) siguiendo las introducciones del fabricante.

La PCR cuantitativa se realizó utilizando el protocolo sugerido por el fabricante de Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) en reacciones de 10 µl y 10 ng de cDNA total. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando la herramienta Primer-Blast del NCBI. El gen GAPDH se utilizó como control de amplificación. El ensayo se realizó por triplicado en placas ópticas de 384 pocillos utilizando el sistema ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Los datos fueron recogidos utilizando el software Sequence Detector (SDS versión 2.4, Applied Biosystem). Las muestras se analizaron siguiendo el método doble delta CT ($\Delta\Delta CT$).

GEN	Oligo sentido	Oligo antisentido
FOXO3A	GTTTGGACCTTCGTCTCTGAA	GTAGTGTGACACGGAAGAGAAG
Neuroglobin	ACTGTCTCTCCTCTCCAGAAT	CAGGTACTCTCCAATGAAGAC
Pin1	GCAGAGGTCAGATGCAGAAA	TCTGTGCGCAGGATGATATG
HSF-1	CCCTGAAGAGTGAGGACATAAA	GAGTCCATACACTCCTGTTTCC
BVR-A	GGATATGTGTCCAGACGAGAAC	ATAGGCGACATCAACCTCTTG
PROGRANULIN	GGGCATTCTGCCATGATAAC	CAACAGTGACGTCCATCTCTAC
TMEM 106b	CTTGCCAAGGAACAGGAAGA	CACAGACGCCATCACATACA
ephx2	GGAGAAGGTCACAGGGACAC	TTTGGATTGCATGGGACTG
CYP46A1	AGCCGCTATGAGCACATCC	AGGGGAGATGTCCAAGAAGG
GAPDH	AAAATGGTGAAGGTCGGTGTGA	ATGGGCTTCCCGTTGATGAC
Axin2	GAGGGACAGGAACCACTCG	TGCCAGTTTCTTTGGCTCTT
Jun	TGAGTTGGCACCCACTGTTA	TGGCACAGCTTAAGCAGAAA

Tabla3: Lista de los oligonucleóticos utilizados en esta tesis.

10. Análisis estadísticos

Los resultados se representan como media \pm SEM (error estándar de la media). Antes de proceder a la comparación de medias, se analizó la normalidad de distribución de la muestra aplicando prueba Shapiro-Wilk.

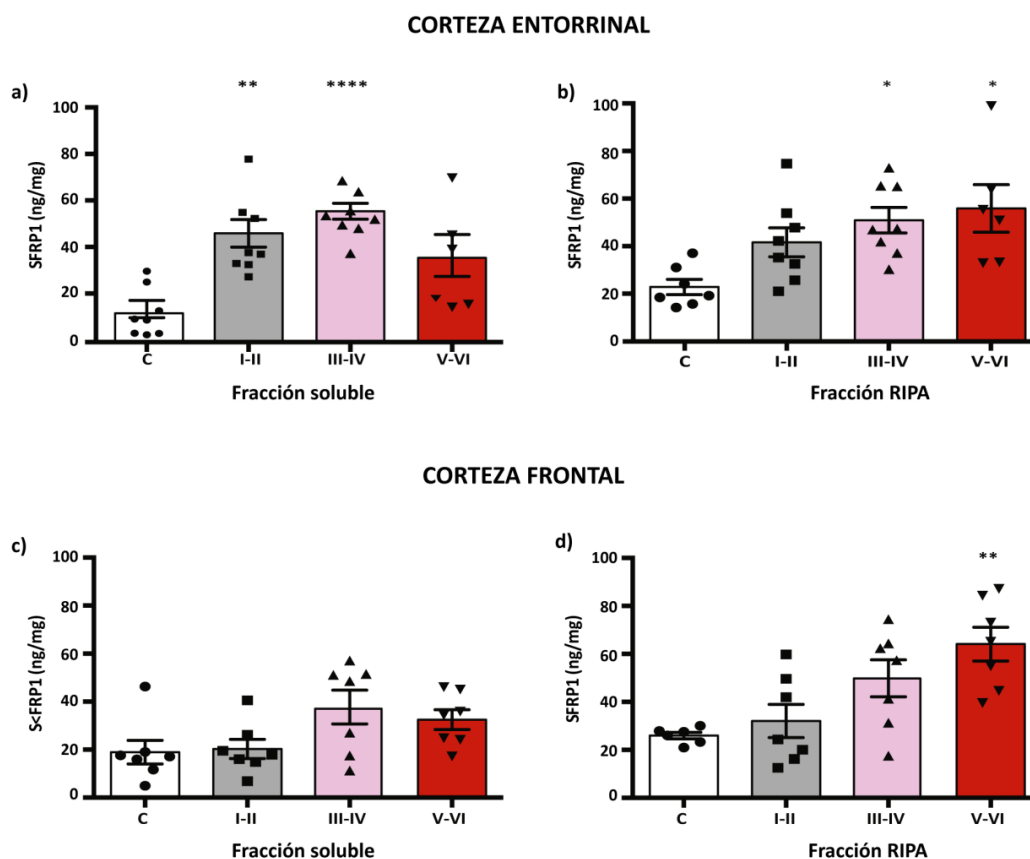
Para comparaciones entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba *t de Student* (para muestras con distribución normal) o la U de Mann-Whitney (para no paramétricas). En el caso de comparaciones múltiples, los resultados con distribución normal se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una o dos vías, dependiendo del número de factores implicados.

Los asteriscos representan el P valor como se indica a continuación: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

RESULTADOS

1. Los niveles de SFRP1 aumentan durante la progresión de la EA

Como se detalla en la introducción, los niveles de mRNA de *SFRP1* se encuentran elevados en pacientes con EA. Para analizar si este aumento correlacionaba con un incremento en los niveles de la proteína, cuantificamos los niveles de la proteína SFRP1 en muestras de corteza cerebral procedente de pacientes con EA. Para realizar este estudio, pusimos a punto un ELISA tipo sándwich utilizando dos anticuerpos monoclonales contra la proteína recombinante SFRP1 humana, generados en colaboración con la Dr. Domínguez (Instituto Carlos III). Analizamos los niveles de SFRP1 en extractos cerebrales de corteza entorrinal, región donde aparecen los primeros signos de la enfermedad, y corteza frontal de pacientes con EA esporádico. Para este análisis se utilizaron muestras de pacientes en distintos estadios de la enfermedad según la clasificación de Braak and Braak, basada en la localización y cantidad de ovillos neurofibrilares en distintas regiones del cerebro: BB I-II, BB III-IV y BB V-VI y los comparamos con muestras control de edad similar. Analizamos tanto la fracción soluble como la insoluble (RIPA) de cada extracto. Las muestras fueron cedidas por el Dr. Ferrer del Instituto de Neuropatología HUB-ICO-IDIBELL.



RESULTADOS

Figura 14. Los niveles corticales de SFRP1 aumentan en pacientes de EA. Las gráficas muestran los niveles de SFRP1, medidos por ELISA, presentes en extractos de corteza entorrinal (a, b) y frontal (c, d) en la fracción soluble (a, c) y la fracción RIPA (b, d) en muestras control y pacientes EA en diferentes estadios de la enfermedad, como indicamos en el gráfico. Los datos fueron analizados con test *two-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ** $0,01 > p \geq 0,001$; **** $p < 0,00001$.

El análisis de los datos mostró una correlación positiva entre los niveles de SFRP1 y la progresión histopatológica de la EA. Detectamos un aumento significativo en los niveles de SFRP1 desde estadios tempranos de la enfermedad (I-II) en extractos de corteza entorrinal, tanto en la fracción soluble como en la fracción RIPA (Figura 14a, b). En estadios más avanzados, los niveles de SFRP1 también aparecen elevados en la corteza frontal, región donde los signos patológicos aparecen en estadios tardíos (Figura 14c, d).

Para averiguar si el aumento de la expresión de SFRP1 observado en muestras humanas ocurría también en ratón, utilizamos un modelo murino de amiloidogénesis (APP;PS1), usado por muchos investigadores para estudiar algunos aspectos de la EA (Jankowsky et al., 2004). En un ELISA adaptado, que permite analizar los niveles de Sfrp1 en extractos cerebrales de ratón, detectamos un incremento significativo en los ratones APP;PS1 en comparación con ratones control a los 8 meses de edad (Figura 15a). Posteriormente, quisimos analizar si los niveles de Sfrp1 en ratones APP;PS1 también aumentaban con la progresión de la enfermedad (Figura 15b). Observamos que los niveles de Sfrp1 comienzan a aumentar de una manera más pronunciada a partir de los 6 meses de edad en los ratones APP;PS1, siendo significativo a partir de los 8 meses, cuando los ratones APP;PS1 presentan un deterioro cognitivo detectable (Radde et al., 2006). Por lo que concluimos que, tanto en extractos cerebrales de pacientes de EA como en los ratones APP;PS1, el aumento de los niveles de SFRP1 se asocian a la progresión de la enfermedad.

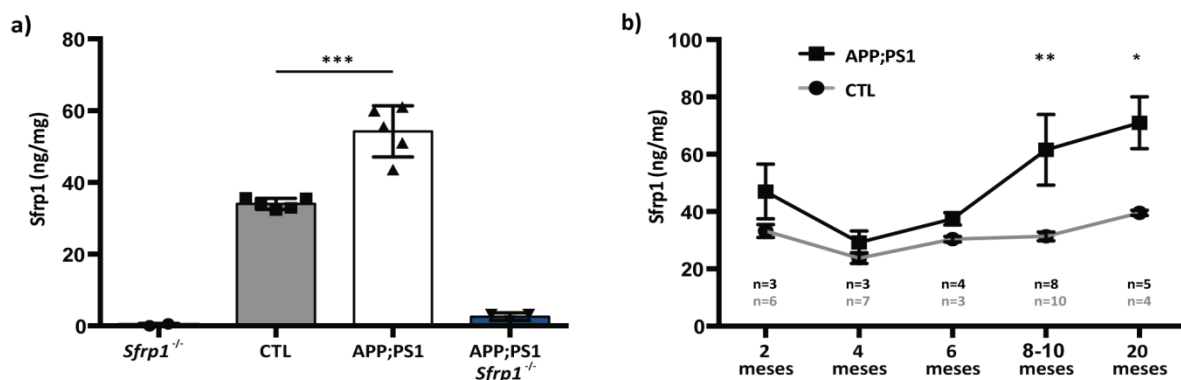


Figura 15. Los niveles de Sfrp1 en cerebro aumentan progresivamente con la edad en ratones APP;PS1. (a) Cuantificación de los niveles de Sfrp1, medidos por ELISA, en extractos cerebrales de ratones controles y APP;PS1 a los 8 meses de edad. No se detecta señal en los extractos de ratones nulos para *Sfrp1* ni en los ratones APP;PS1;*Sfrp1*^{-/-}. (b) Análisis de los niveles de Sfrp1, medido por ELISA, en extractos cerebrales de ratones control y APP;PS1 a diferentes edades, indicados en el gráfico. Se analizaron los resultados con un test *two-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * 0,05 > p ≥ 0,01; ** 0,01 > p ≥ 0,001; *** p < 0,0001.

2. Generación y validación de un modelo murino de sobre-expresión de Sfrp1 en cerebro

2.1. Generación de un ratón doble transgénico murino GFAP-tTA/TRE-Sfrp1

Para determinar si Sfrp1 podía promover neuroinflamación o alteraciones sinápticas al margen de Aβ, generamos un modelo murino doble transgénico inducible TetOFF que permitiera la sobre-expresión de *Sfrp1* en astrocitos de forma inducible. Estos ratones se generaron mediante el cruce de dos ratones modificados genéticamente (Figura 16a). La primera línea de ratón contiene un constructo con un elemento de respuesta a tetraciclina que permite la expresión simultánea de las proteínas Sfrp1 y βgal, este último utilizado como reportero (TRE-Sfrp1). La segunda línea de ratón expresa un transactivador de tetraciclina (tTA*M2) bajo el promotor del gen que expresa la proteína del filamento intermedio glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) Tg(GFAP-tTA*M2), una proteína que se expresa en astrocitos. Cuando ambos transgenes se expresan en el mismo ratón (GFAP-tTA/TRE-Sfrp1), las proteínas Sfrp1 y βgal comienzan a expresarse de forma simultánea, en ausencia de doxiciclina. Al ser un modelo inducible, la administración de doxiciclina reprime la expresión de ambas proteínas (Figura 16a).

Elegimos los astrocitos como células productoras de Sfrp1 porque, según estudios previos del laboratorio, son una fuente endógena de la síntesis de la proteína Sfrp1. Además, la proteína GFAP comienza a expresarse al final de la embriogénesis y en estadios postnatales, lo cual minimiza posibles alteraciones producidas por la sobre-expresión de esta proteína durante el desarrollo.

Verificamos mediante un ELISA que los niveles de expresión Sfrp1 durante el desarrollo eran similares a los controles. Para ello utilizamos extractos cerebrales de ratones

RESULTADOS

GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 y control a 3 días postnatales y observamos niveles muy similares en ambos genotipos (Figura 16b). De esta manera descartamos posibles efectos de la sobre-expresión durante el desarrollo.

Los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 son viables, fértiles y no presentan alteraciones ni en el peso corporal ni en el tamaño del cerebro (Figura 16c, d).

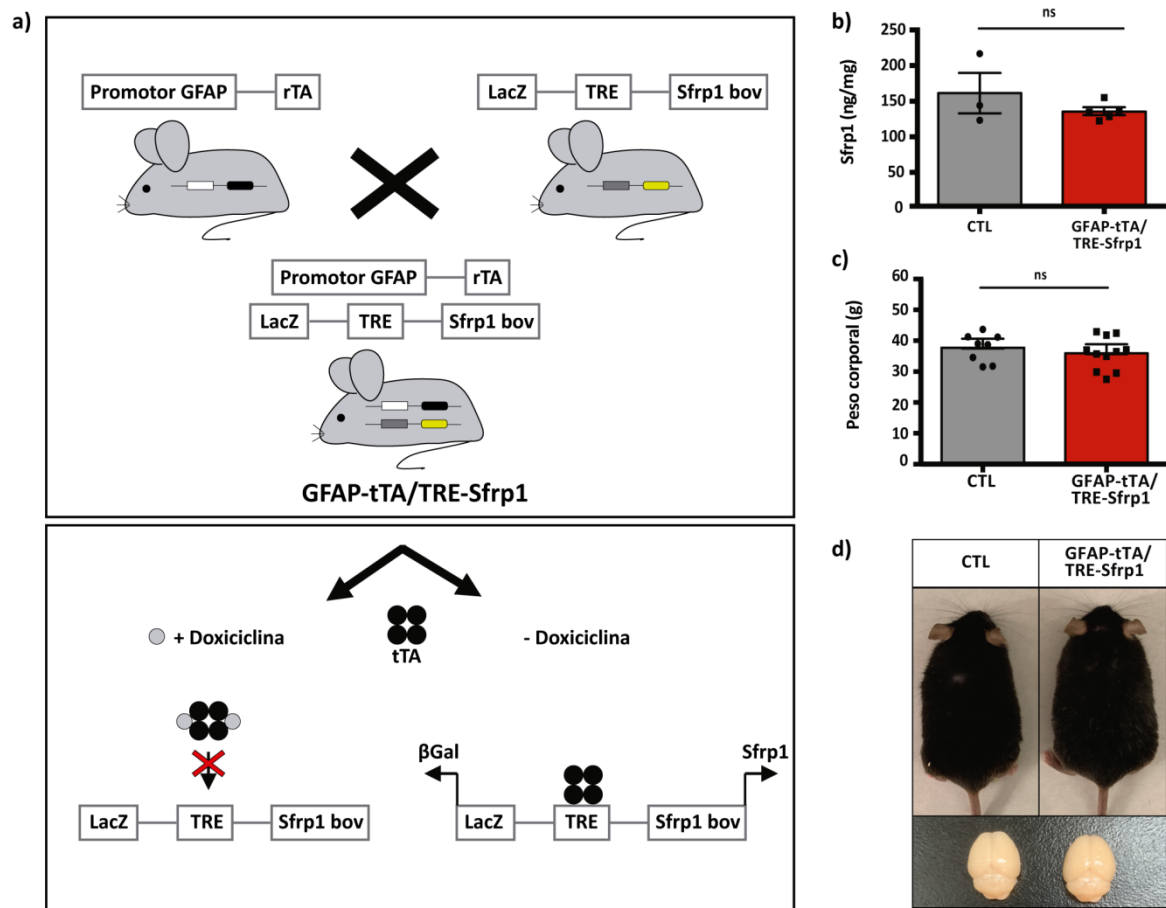


Figura 16. Generación de un ratón doble transgénico condicional que sobre-expresa *Sfrp1* en cerebro. (a) Esquema de la generación del ratón GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 que sobre-expresa *Sfrp1* específicamente en astrocitos. (b) Niveles de *Sfrp1* medidos por ELISA en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a 3 días postnatales. (c) Cuantificación del peso corporal de los ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 8 meses de edad. (d) Fotografías comparativas del tamaño corporal y del cerebro de los ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. ns = no significativo.

2.2. Validación del modelo murino doble transgénico GFAP-tTA/TRE-Sfrp1

Realizamos diferentes ensayos para verificar la sobre-expresión de Sfrp1 en el modelo GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Analizamos la expresión de la proteína reportera β gal mediante ensayos de inmunofluorescencia en secciones de cerebro. Observamos que en los ratones controles no se detecta señal; sin embargo, los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentaban células β gal positivas por todo el cerebro, acumulándose especialmente en la corteza, región hipotalámica y región hipocampal, aunque solo mostramos imágenes de esta última región (Figura 17a, b). Además, comprobamos que la proteína β gal se localiza en las mismas células positivas para el marcador de astrocitos GFAP, confirmando que la sobre-expresión es exclusiva en estas células (Figura 17c, d). Finalmente, observamos señal de Sfrp1 solo en algunas células β gal positivas (Figura 17e, f), ya que al ser una proteína muy difusible, los niveles en las células productoras son bajos y difíciles de detectar.

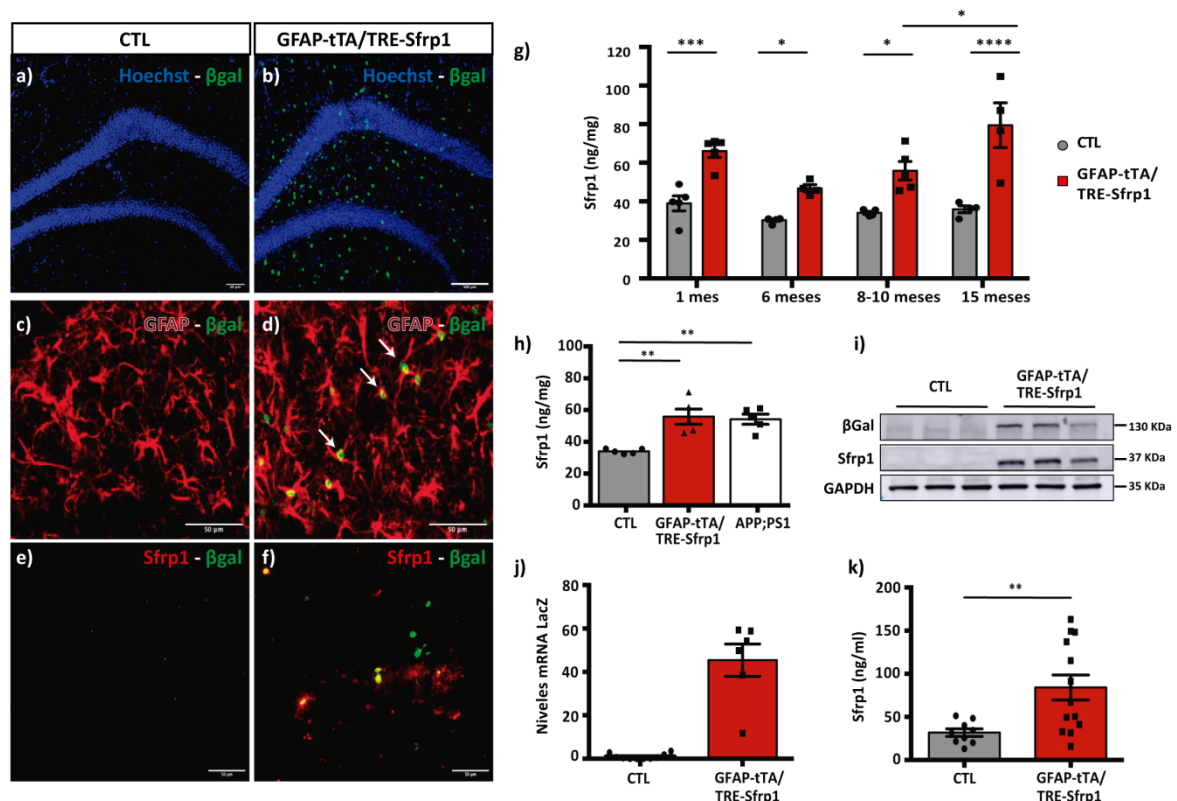
Una vez comprobamos que los astrocitos de los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 sobre-expresan Sfrp1, cuantificamos los niveles de Sfrp1 en extractos cerebrales mediante un ELISA en ratones de 1, 6, 8-10 y 15 meses de edad, comparándolos con ratones control a las mismas edades. El análisis de los datos reveló que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentaban un incremento significativo comparado con ratones control, a partir del mes de edad y este aumento se mantiene constante hasta los 8-10 meses. Sin embargo, el incremento se acentúa a los 15 meses (Figura 17g). Además, los niveles de Sfrp1 presentes en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 eran similares a los detectados en los ratones APP;PS1 a los 8-10 meses de edad (Figura 17h).

Análisis complementarios mediante ensayos de Western blot confirmaron que los niveles de Sfrp1 en la región hipocampal eran mayores en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 en comparación con los controles a los 8 meses de edad (Figura 17i). La expresión del transgen se confirmó también analizando por PCR cuantitativa la presencia de mRNA *Lacz* en el hipocampo de ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (Figura 17j).

Estudios previos del laboratorio demostraron que los niveles de SFRP1 también están incrementados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EA (Esteve et al., 2019b).

RESULTADOS

Las paredes de los ventrículos laterales están rodeadas por astrocitos y células madre que contribuyen a la composición proteica del LCR (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Extrajimos LCR de la cisterna magna de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 8-10 meses de edad y realizamos un ELISA mediante el cual, observamos un incremento significativo en los niveles de Sfrp1 en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 respecto los ratones control (Figura 17k).



Todos los datos mostrados hasta el momento proceden de ratones heterocigotos GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 para ambos constructos. En este último año hemos logrado llevar la colonia a homocigosis para el transgen TRE-Sfrp1. La cuantificación de los niveles de expresión de Sfrp1 a los 6 meses de edad medidos por ELISA mostró que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos presentaban niveles significativamente más elevados que los heterocigotos y los controles a la misma edad (Figura 18a). De hecho, los niveles de Sfrp1 en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos a los 6 meses son muy similares a los niveles de GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 15 meses de edad.

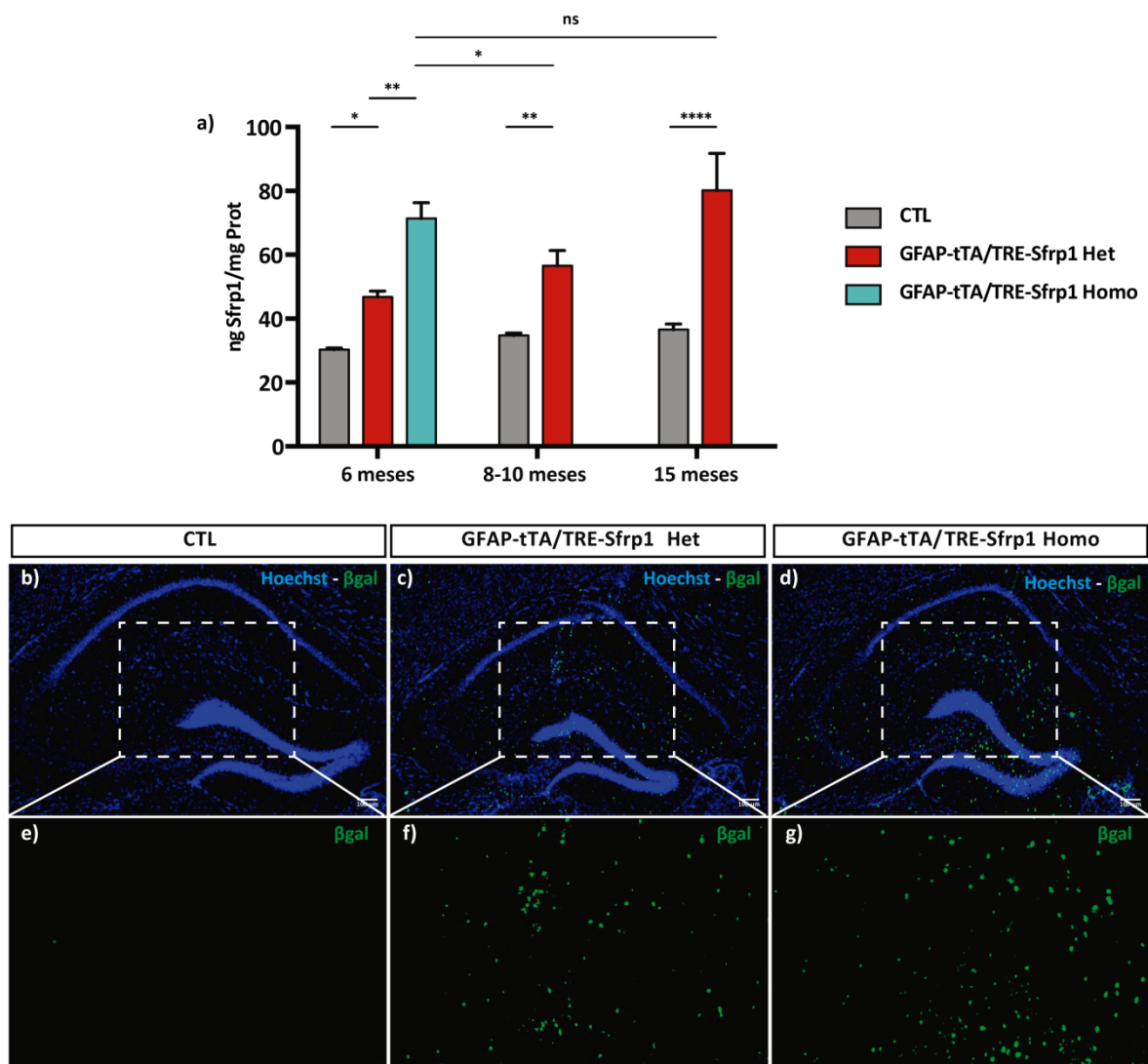


Figura 18. La expresión de Sfrp1 depende de la dosis génica. (a) Cuantificación de los niveles de Sfrp1 por ELISA en ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a los 6 meses comparando con los niveles a 8-10 y 15 meses. Los datos fueron analizados con un test two-way ANOVA seguido de un test de Bonferroni. (b-d) Inmunofluorescencia en cortes coronales de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a 6 meses de edad utilizando un anticuerpo anti-βgal. Se utilizó Hoechst como marcador nuclear. Barra de escala 100 μm. Los

RESULTADOS

recuadros blancos punteados señalan las regiones amplificadas en (e-g). Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ** $0,01 > p \geq 0,001$; **** $p < 0,00001$; ns= no significativo.

Realizamos ensayos complementarios con técnicas de inmunofluorescencia para detectar la presencia de la proteína reportera β gal, lo cual corroboró el aumento de la expresión en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos en comparación con los heterocigotos, validando de esta manera los datos obtenidos en el ELISA (Figura 18b-g).

2.3. Sfrp1 no modula la vía Wnt/ β catenina. Sfrp1 interacciona con ADAM10

Como hemos explicado en la introducción, Sfrp1 actúa como un modulador de la vía de Wnt (Bovolenta et al., 2008). Por eso, altos de niveles de la proteína en el cerebro podrían interferir con su activación. Para estudiar si la sobre-expresión de Sfrp1 estaba modulando la vía de Wnt analizamos por PCR cuantitativa los niveles de mRNA en la corteza cerebral de 2 de sus genes diana, Axina2 y c-Jun (Gan et al., 2008, MacDonald et al., 2009). El análisis de los niveles de expresión en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos no mostró diferencias entre los dos genotipos (Figura 19a). Estos resultados nos indican que, en principio y en este contexto, Sfrp1 no modula la señalización de Wnt.

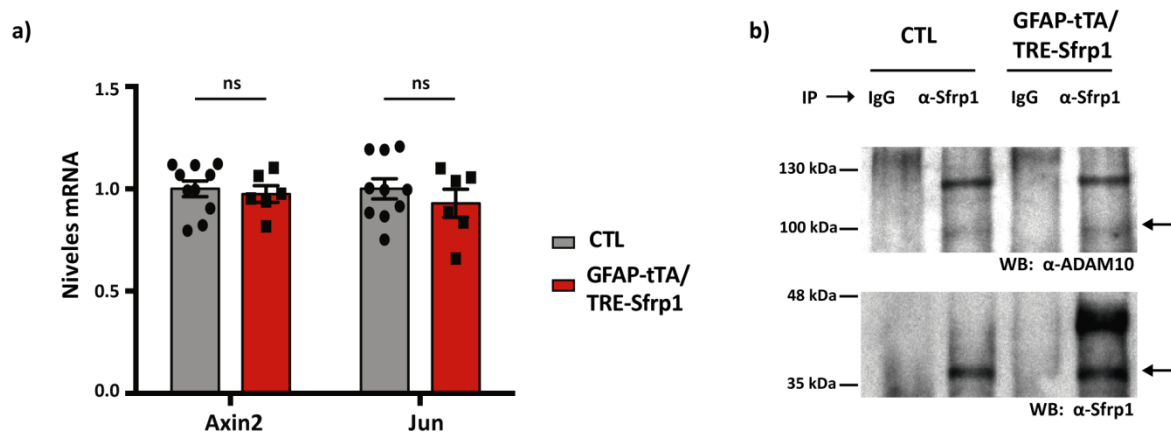


Figura 19. Sfrp1 interacciona con ADAM10, pero no modifica los niveles de expresión de componentes de la vía de Wnt. (a) Análisis de los niveles de expresión de 2 genes diana y efectores de la vía de Wnt medidos por qPCR en la corteza cerebral de ratones control (n=10) y ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (n=6) a los 8 meses de edad. (b) Coimmunoprecipitación de Sfrp1 y ADAM10 en sinaptosomas de ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 8 meses de edad.

Estudios previos del laboratorio demostraron que Sfrp1 se une y modula negativamente la actividad proteolítica de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). De acuerdo con estos resultados, ensayos de co-inmunoprecipitación y Western blot revelaron la interacción entre Sfrp1 y ADAM10 en preparaciones de sinaptosomas a los 10 meses de edad (Figura 19b).

Concluimos que la sobre-expresión de Sfrp1 no altera la vía de señalización de Wnt, pero sí interacciona con ADAM10 en preparaciones de sinaptosomas, lo que podría afectar a la actividad de la metaloproteasa en neuronas y células glía, afectando a la neuroinflamación y plasticidad sináptica. Por ello, nos propusimos estudiar las posibles alteraciones de la sobre-expresión de Sfrp1 tanto en la neuroinflamación como en la función sináptica.

3. Consecuencias morfológicas y funcionales de la sobre-expresión de Sfrp1 en el cerebro

3.1. Sfrp1 induce neuroinflamación

Ante un estímulo inflamatorio, las células gliales adquieren un estado reactivo caracterizado por un cambio en su morfología, secreción de citoquinas y activación de la fagocitosis (Heneka et al., 2015).

Estudios previos del laboratorio han demostrado un fuerte aumento de la expresión de Sfrp1 durante procesos inflamatorios en distintos tejidos. En el cerebro este incremento está asociado con la activación de células gliales en los ratones APP;PS1 (Esteve et al., 2019b). Analizamos mediante ensayos de inmunofluorescencia si la sobre-expresión de Sfrp1 era suficiente para generar una respuesta inflamatoria a los 2 y 8-10 meses de edad en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos. Nos centramos en la región hipotalámica, que es donde encontramos el mayor número de células β gal positivas y, por lo tanto, mayor síntesis de Sfrp1. Utilizamos el anticuerpo anti-Iba1 como marcador de microglia (Figura 20a-d) y el anticuerpo anti-GFAP como marcador de astrocitos (Figura 20f-i). La cuantificación de los niveles de fluorescencia mostró que a los 8-10 meses de edad había un aumento significativo tanto en los niveles de GFAP como en Iba1 en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 comparados con los controles. Estos datos mostraron un aumento en la

RESULTADOS

reactividad en ambos tipos celulares (Figura 20e), no presente a los 2 meses de edad (Figura 20j).

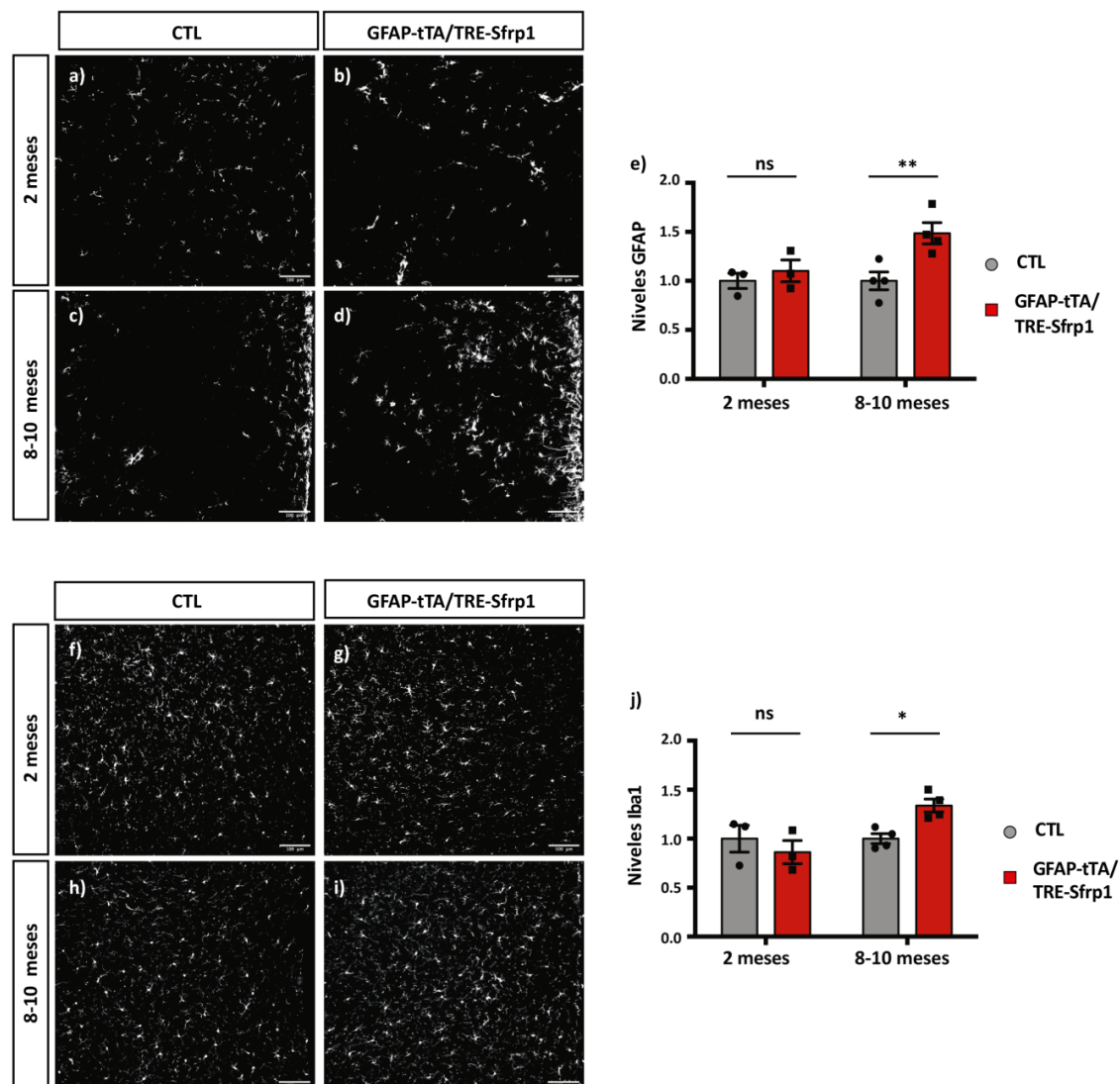


Figura 20. Sfrp1 induce la activación de las células gliales. Inmunofluorescencia en cortes coronales en la región hipotalámica del cerebro a 2 (a, b – f, g) y 8-10 (c, d – h, i) meses de edad en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Utilizamos anticuerpos anti-GFAP un marcador de astrocitos (a-d) y anti-iba1, un marcador de microglia (f-i). Barra de escala 100 μ m. (e-j) Cuantificación de la inmunofluorescencia de GFAP (e) e Iba1 (j). Los datos fueron analizados con un test *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * 0,05 > p \geq 0,01; ** 0,01 > p \geq 0,001.

En paralelo, realizamos este mismo ensayo en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a los 6 meses de edad (Figura 21a-c). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los marcadores Iba1 y GFAP en la región hipotalámica, mostró que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos presentaban un incremento significativo de microgliosis comparados con los ratones controles, mientras que los

heterocigotos a esa edad todavía no presentaban alteraciones (Figura 21d). Además, existía una correlación positiva entre los niveles de Sfrp1 y la intensidad de inmunofluorescencia de Iba1, lo que indica que los niveles de microgliosis inducidos por Sfrp1 son dosis-dependientes. (Figura 21e).

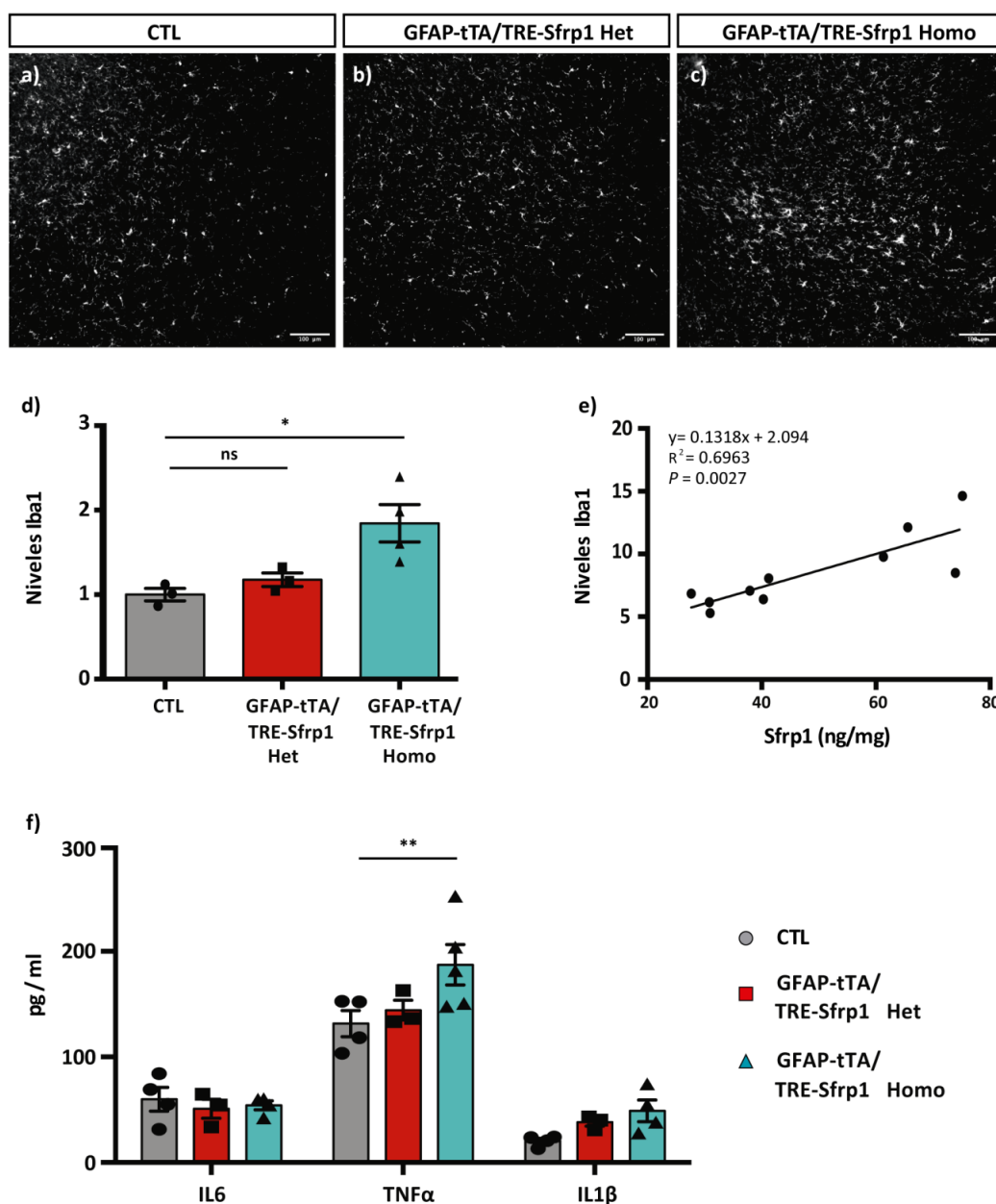


Figura 21. Sfrp1 induce la activación de la microglia de forma dosis-dependiente. (a-c) Inmunofluorescencia de cortes coronales en ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a los 6 meses de edad utilizando un anticuerpo anti-Iba1, marcador de microglia. Barra de escala 100 μ m. (c) Cuantificación de los niveles de Iba1. (d) Representación de los niveles de Iba1 frente los niveles de Sfrp1. (e) ELISA específico de citoquinas pro-inflamatorias IL6, TNF α y IL1 β en extractos cerebrales de ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos. Los datos fueron analizados con un test *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * 0,05 > p \geq 0,01; ** 0,01 > p \geq 0,001; ns= no significativo.

Como hemos mencionado anteriormente, la neuroinflamación se caracteriza por la secreción de múltiples citoquinas por parte de la microglia y los astrocitos. Realizamos ensayos complementarios para analizar la activación de la respuesta inflamatoria midiendo por ELISA los niveles de varias citoquinas pro-inflamatorias (IL1 β , TNF α o IL6) en extractos cerebrales procedentes de ratones control, GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a los 6 meses de edad. Detectamos diferencias significativas en TNF α , sin apreciarse cambios en los niveles de IL1 β e IL6 en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos frente al control. Sin embargo, no observamos cambios en ninguna de las citoquinas en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos (Figura 21f).

La respuesta inflamatoria induce la activación de numerosas vías de señalización, por ejemplo la vía de MAPK/p38 (proteínas quinasas activadoras de mitógenos) (Cuadrado and Nebreda, 2010). La actividad de p38, mediado por su grado de fosforilación, participa en la regulación de la transcripción de mediadores de la inflamación, como citoquinas pro-inflamatorias, y en la fosforilación de distintos sustratos inflamatorios, como la proteína Tau. Esta fosforilación conlleva la generación de una forma neurotóxica presente en enfermedades neurodegenerativas como la EA y la demencia fronto-temporal (Lee and Kim, 2017).

Analizamos el grado de fosforilación de p38 en extractos de hipocampo en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos frente a ratones control a los 8 meses de edad mediante ensayos de Western blot (Figura 22a, b). La cuantificación del grado de fosforilación de p38 frente a los niveles de p38 totales reveló un incremento significativo en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos. Realizamos el mismo análisis para medir el grado de fosforilación de la proteína tau, y encontramos un aumento significativo en los cerebros GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 comparado con los controles (Figura 22c, d).

En conjunto, concluimos que la sobre-expresión de Sfrp1 es suficiente para desencadenar una respuesta inflamatoria en el cerebro, induciendo un aumento en los niveles de TNF α y la activación de vías relacionadas con la neuroinflamación. Además, la respuesta neuroinflamatoria depende de la edad y de los niveles de Sfrp1.

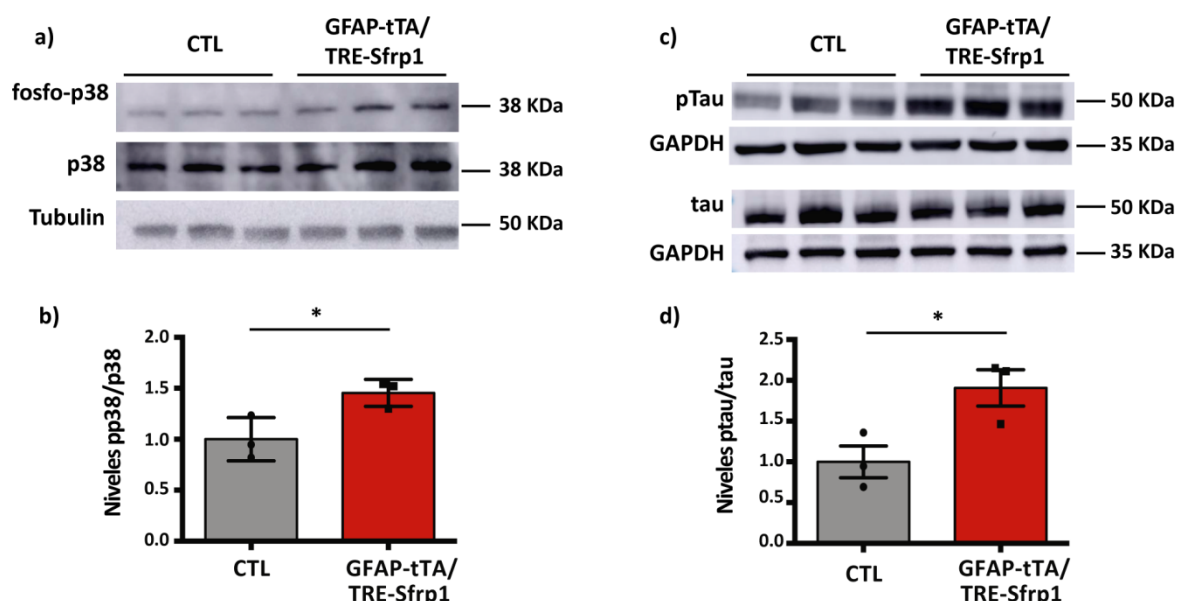


Figura 22. Sfrp1 induce un incremento en la fosforilación de p38 y tau. Western blot p38 fosforilado normalizado frente a p38 total (a) y tau hiperfosforilado (marcado con el anticuerpo PHF1 normalizado frente tau total (c). Se utilizó GAPDH como control de carga. (f, h) Cuantificación de los niveles de la fosforilación de p38 (b) y tau hiperfosforilado (d), normalizados frente al control. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $p < 0,05$.

3.2. Sfrp1 altera la morfología de las neuronas

Sfrp1 altera la morfología neuronal en cultivos de neuronas hipocampales (Rosso et al., 2005). Nos propusimos estudiar si *in vivo* el aumento de Sfrp1 se asociaba con alteraciones en la plasticidad sináptica. Analizamos si la sobre-expresión de Sfrp1 era capaz de modificar la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 2 y 10 meses de edad. Para ello, infectamos neuronas del giro dentado (GD) del hipocampo mediante la inyección intracraneal de un Sinbdi virus que expresaba la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Figura 23a, b). Las neuronas infectadas con los virus expresan la proteína GFP, lo que permite visualizar la neurona completa, incluidas las espinas dendríticas.

En primer lugar, analizamos la longitud dendrítica total de las neuronas granulares del GD infectadas a los 2 meses (Figura 23c, d) y 10 meses de edad (Figura 10g, h). Las neuronas de los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 10 meses presentaban una longitud dendrítica significativamente menor que los controles, sin apreciarse cambios significativos a los 2 meses. (Figura 23e, i). A continuación, analizamos la existencia de posibles cambios en la

RESULTADOS

ramificación del árbol dendrítico de las neuronas mediante un análisis de *Sholl*. Este análisis consiste en la cuantificación del número de intersecciones del árbol dendrítico que se encuentra dentro una serie de círculos concéntricos dibujados a partir del soma de la neurona como se muestra en la Figura 10c. Este análisis mostró que las neuronas de los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentaban una reducción significativa en la ramificación dendrítica a los 10 meses, pero no a los 2 meses de edad (Figura 23f, j).

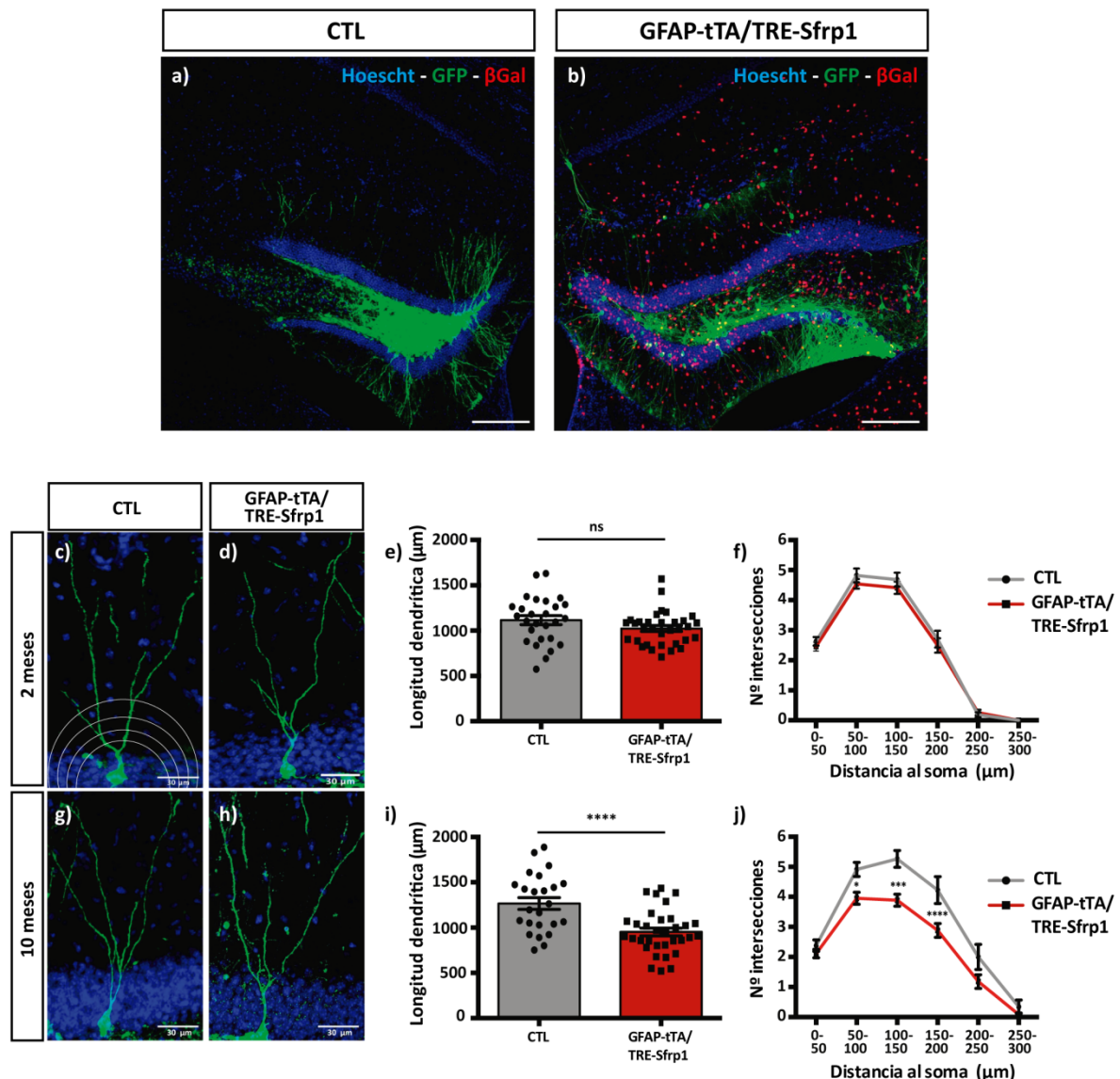


Figura 23. Sfrp1 reduce la arborización dendrítica de las neuronas del GD. (a, b) Imágenes representativas de la expresión de GFP en cortes coronales de hipocampo de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 10 meses de edad infectados con sinbdi virus/GFP para evidenciar la morfología neuronal. La expresión de GFP fue detectada por inmunofluorescencia, en rojo un anticuerpo anti-βgal y los núcleos en azul se marcaron con Hoechst. Barra de escala 200 μm. Imágenes representativas de neuronas individuales control (c, g) y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (d, h) a 2 meses (c, d) y 10 meses (g, h) de edad. Barra de escala 30 μm. Cuantificación de la longitud dendrítica

de cada grupo experimental a 2 (e) y 10 (i) meses de edad. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. Análisis de ramificación dendrítica (análisis de *Sholl*) expresado como número de intersecciones en función de la distancia al soma a 2 (f) y 10 (j) meses de edad. Los datos fueron analizados con un test *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. N=30 neuronas analizadas por condición en 3 ratones control y 4 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; *** $0,001 > p \geq 0,0001$; **** $p < 0,0001$; n.s, no significativo.

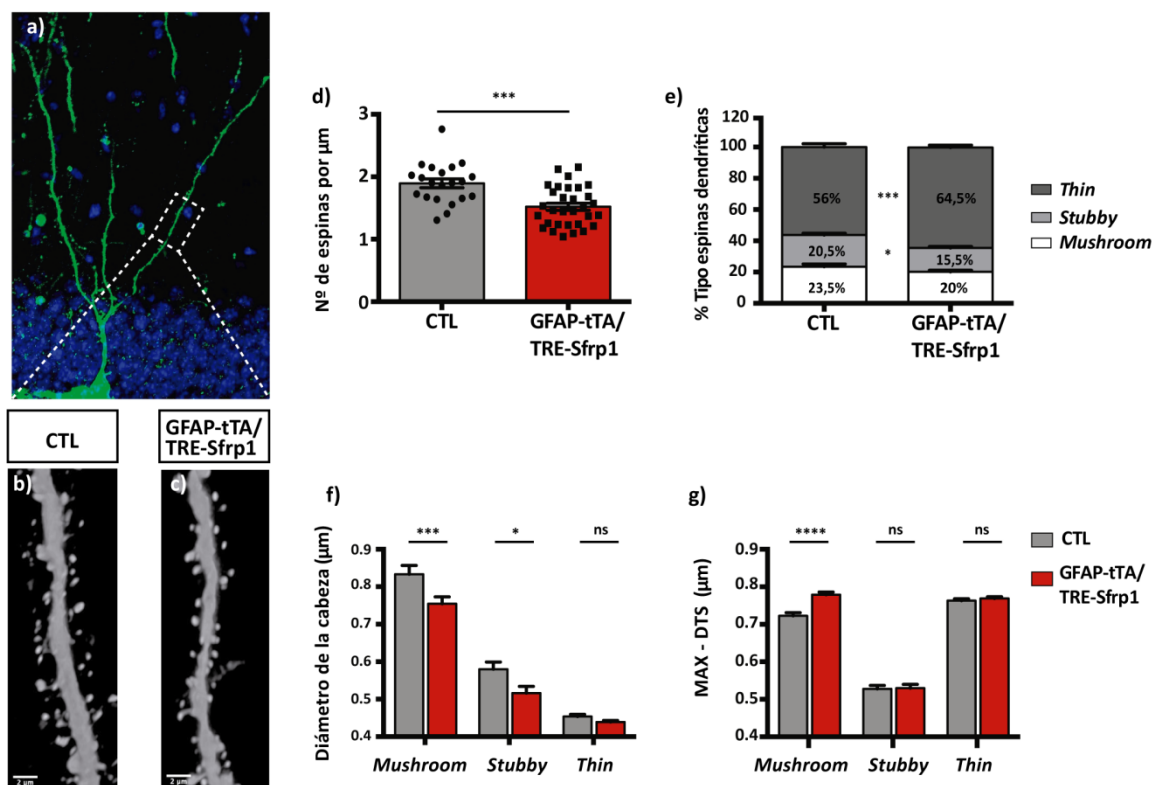
3.3. La sobre-expresión de Sfrp1 provoca una disminución en la densidad de espinas dendríticas

A lo largo de la superficie de las dendritas se encuentran las espinas dendríticas, que representan el componente post-sináptico de la mayor parte de las sinapsis excitatorias (van der Zee, 2015). Ya que la morfología de la neurona se ve alterada por la sobre-expresión de Sfrp1, estudiamos si el número o la morfología de espinas dendríticas también se encontraba afectado, lo cual tendría consecuencias deletéreas en la transmisión sináptica.

La cuantificación del número de espinas dendríticas mostró una disminución muy significativa en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 comparado con los controles (Figura 24d). En cuanto a su morfología, analizamos el porcentaje de espinas *thin*, *stubby* o *mushroom* respecto al número total de espinas en ambos genotipos, utilizando un software específico llamado *NeuronStudio*. Observamos que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentan un aumento significativo en el número de espinas dendríticas *thin*, y una reducción en las *stubby*, sin cambios significativos en el número de espinas *mushroom* en comparación con los controles (Figura 24e). Además, analizamos el diámetro de la cabeza y la longitud total de cada tipo de espina dendrítica (MAX-DTS). Los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 mostraban una disminución del diámetro de la cabeza de las espinas *mushroom* y *stubby*, sin cambios significativos en las espinas *thin* (Figura 24f). En cuanto a la longitud total de la espina, vimos que sólo en las espinas *mushroom* había un aumento significativo del tamaño en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1, en comparación con los controles (Figura 24g).

Estos datos, en su conjunto, demuestran que la sobre-expresión de Sfrp1 en el cerebro no alteran la formación del árbol dendrítico de las neuronas hipocámpales jóvenes. Sin embargo, con el envejecimiento, altos niveles de Sfrp1 reducen la arborización dendrítica de las neuronas e inducen una pérdida del número de espinas dendríticas, acompañado de un cambio en su morfología hacia una forma menos estable. Asimismo, las espinas *mushroom* muestran una cabeza más pequeña, lo cual corresponde con conexiones

sinápticas débiles o silenciosas (Kasai et al., 2003). Las alteraciones en el número y forma de las espinas dendríticas suelen ir asociadas a una disminución en el número de sinapsis.



3.4. La sobre-expresión de Sfrp1 en astrocitos provoca una reducción en el número de sinapsis

Las sinapsis se clasifican en excitatorias (glutamatérgicas) o inhibitorias (GABAérgicas) dependiendo del neurotransmisor al que respondan (Turko et al., 2019). Analizamos la densidad sináptica de ambos tipos de sinapsis en la región CA1 del hipocampo en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 2 y 8 meses de edad. Cuantificamos el número de sinapsis excitatorias mediante un ensayo de inmunofluorescencia utilizando

anticuerpos que reconocen proteínas localizadas específicamente en la región pre- y post-sináptica: como marcador pre-sináptico utilizamos un anticuerpo anti-Bassoon (Figura 25a, d, h, k) y como marcador post-sináptico el anticuerpo anti-Homer (Figura 10b, e, i, l). Mostramos la colocalización parcial de ambas proteínas (Figura 25c, f, j, m). Mediante un software específico, llamado *Volocity* (McLeod et al., 2017), cuantificamos el número de sinapsis excitatorias, definidas como la colocalización de los marcadores Bassoon y Homer. El análisis de los datos mostró una disminución significativa de las sinapsis excitatorias en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 frente los controles a los 8 meses (Figura 25n) pero no a los 2 meses (Figura 12g).

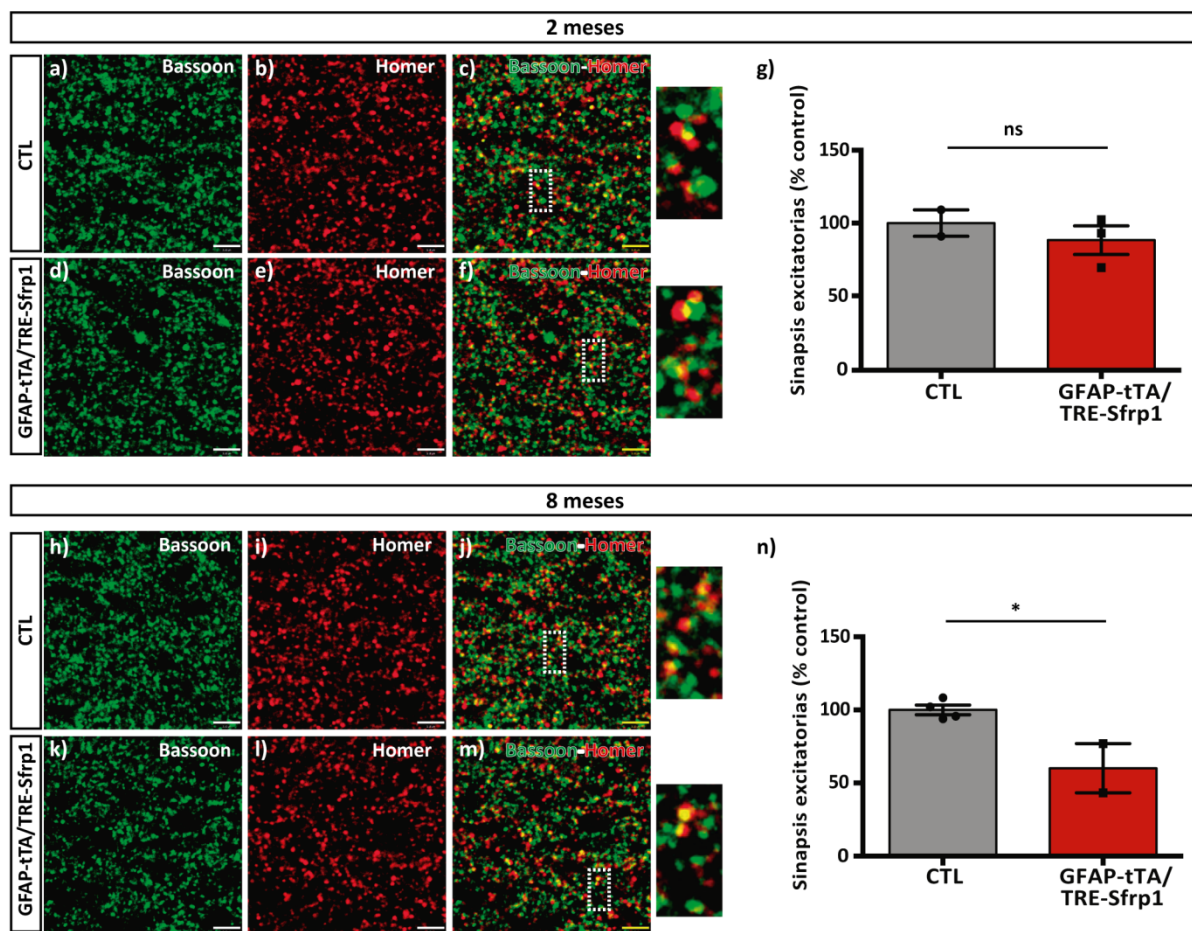


Figura 25. Sfrp1 induce pérdida de sinapsis excitatorias. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo utilizando un anticuerpo anti-Bassoon (marcador pre-sináptico) (a, d, h, k), anti-Homer (marcador post-sináptico) (b, e, i, l) y la colocalización de ambos anticuerpos (c, f, j, m) en ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1a los 2 (a-f) y 8 meses de edad (h-m). Cuantificación del porcentaje de sinapsis excitatorias normalizado respecto al control a 2 (g) y 8 meses de edad (n). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones donde se han obtenido imágenes amplificadas de las sinapsis. Barras de escala 3,1 μ m. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $p < 0,05$; n.s, no significativo.

RESULTADOS

Realizamos el mismo análisis para cuantificar el número de sinapsis inhibitorias en la región CA1 del hipocampo, utilizando anticuerpos que reconocen proteínas localizadas en la región pre-sináptica, anti-Vgat (Figura 26a, d, h, k) y el anticuerpo anti-Gephyrin para marcar la región la post-sináptica (Figura 26b, e, i, l). Mostramos la colocalización parcial de ambos anticuerpos (Figura 26c, f, j, m). Analizando el número de sinapsis inhibitorias con el software *Volocity* no encontramos diferencias significativas entre los ratones control y los GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 en el número de sinapsis inhibitorias ni a los 2 ni a los 8 meses de edad (Figura 26g, n).

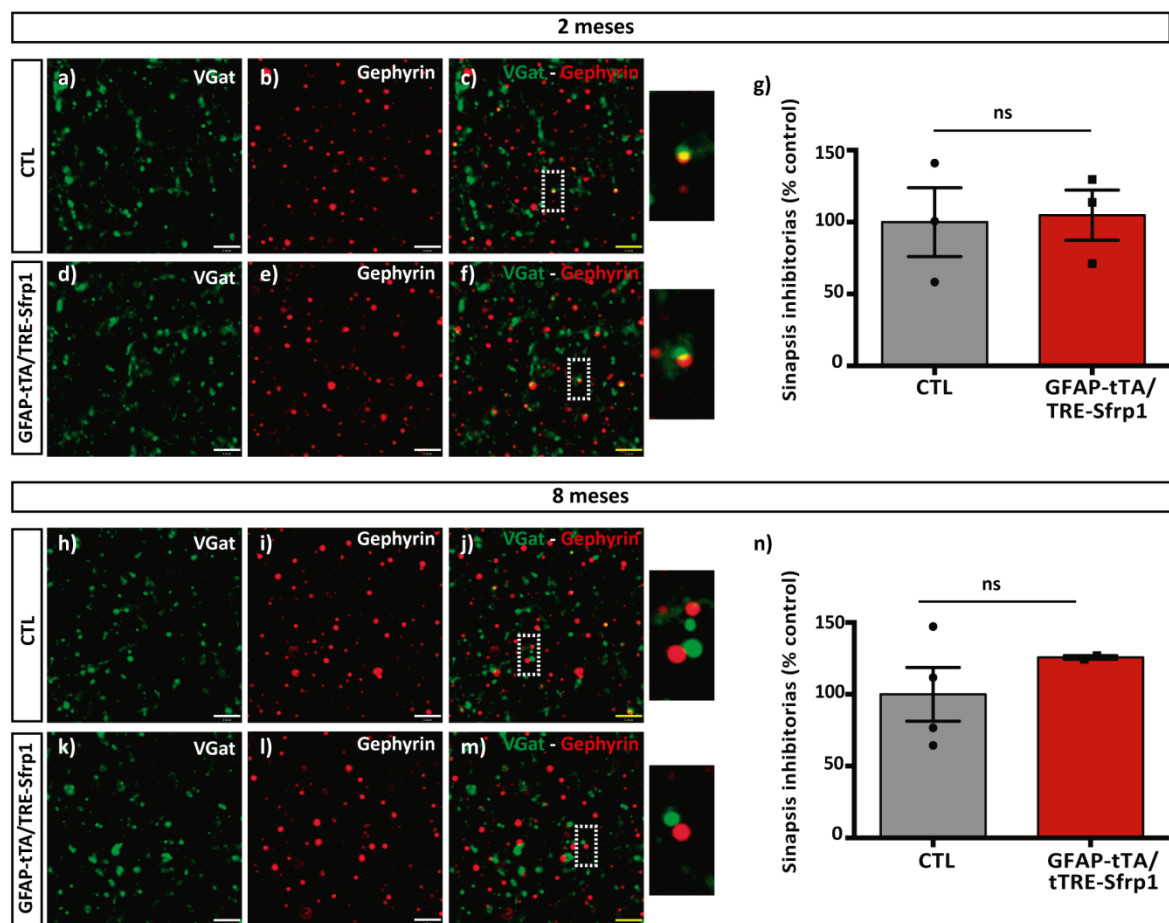


Figura 26. Sfrp1 no altera el número de sinapsis inhibitorias. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo marcados con un anticuerpo anti-Vgat (marcador pre-sináptico) (a, d, h, k), anti-Gephyrin (marcador post-sináptico) (b, e, i, l) y la colocalización de ambos marcadores (c, f, j, m) en ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 2 (a-f) y 8 meses de edad (h-m). Representación gráfica del porcentaje de sinapsis inhibitorias normalizado respecto al control a 2 (g) y 8 meses de edad (n). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones donde se han obtenido imágenes amplificadas de las sinapsis. Barras de escala 3,1 μm. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. ns, no significativo.

Estos resultados nos indican que, la sobre-expresión de Sfrp1 con el tiempo es capaz de inducir una disminución en las sinapsis excitatorias, asociada a la reducción de espinas dendríticas.

3.5. Sfrp1 aumenta los niveles de poda sináptica

La poda sináptica es un proceso fisiológico que consiste en la eliminación controlada de sinapsis mediante fagocitosis, lo que contribuye a la remodelación y afinamiento de la transmisión sináptica por parte de la microglia y en menor medida astrocitos. La activación desregulada y exacerbada de este proceso conduce a la disminución en el número de sinapsis y contribuye al deterioro cognitivo (Hong et al., 2016). Ya que nuestros resultados muestran una activación de la microglia, que conlleva una mayor capacidad fagocítica y al mismo tiempo una disminución del número de sinapsis nos preguntamos si estos dos fenómenos podrían estar relacionados.

Estudiamos los niveles de poda sináptica analizando el grado de fagocitosis sináptica ejercida por la microglia en la región hipocampal de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 10 meses de edad. Realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando 3 anticuerpos diferentes: anti-Iba1, como marcador de la microglia (verde); anti-CD68, marcador de los lisosomas (magenta); y anti-Vglut2, marcador presináptico (rojo) (Figura 27a, b). Realizamos reconstrucciones 3D restringiendo la presencia del marcaje Vglut2 dentro de los lisosomas (CD68) en cada célula de microglia, utilizando el software *Imaris* y siguiendo el protocolo descrito por (Schafer et al., 2014). Cuantificamos el porcentaje de fagocitosis sináptica (volumen de Vglut2 que hay dentro de los lisosomas dividido entre el volumen de la célula microglia) (Figura 27c, d). Resultados todavía preliminares, basados en un pequeño número de células analizadas, mostraron que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 10 meses de edad presentaban una acumulación de marcadores sinápticos en microglia significativamente mayor que los controles (Figura 27e), correlacionando con la disminución en el número de sinapsis. Por lo tanto, al menos parte de la disminución del número de sinapsis se podría deber al aumento de la fagocitosis sináptica por parte de la microglia.

RESULTADOS

Todos estos datos, en su conjunto, indican que la función sináptica en el hipocampo está alterada, lo cual podría tener un efecto directo en los procesos de memoria y aprendizaje.

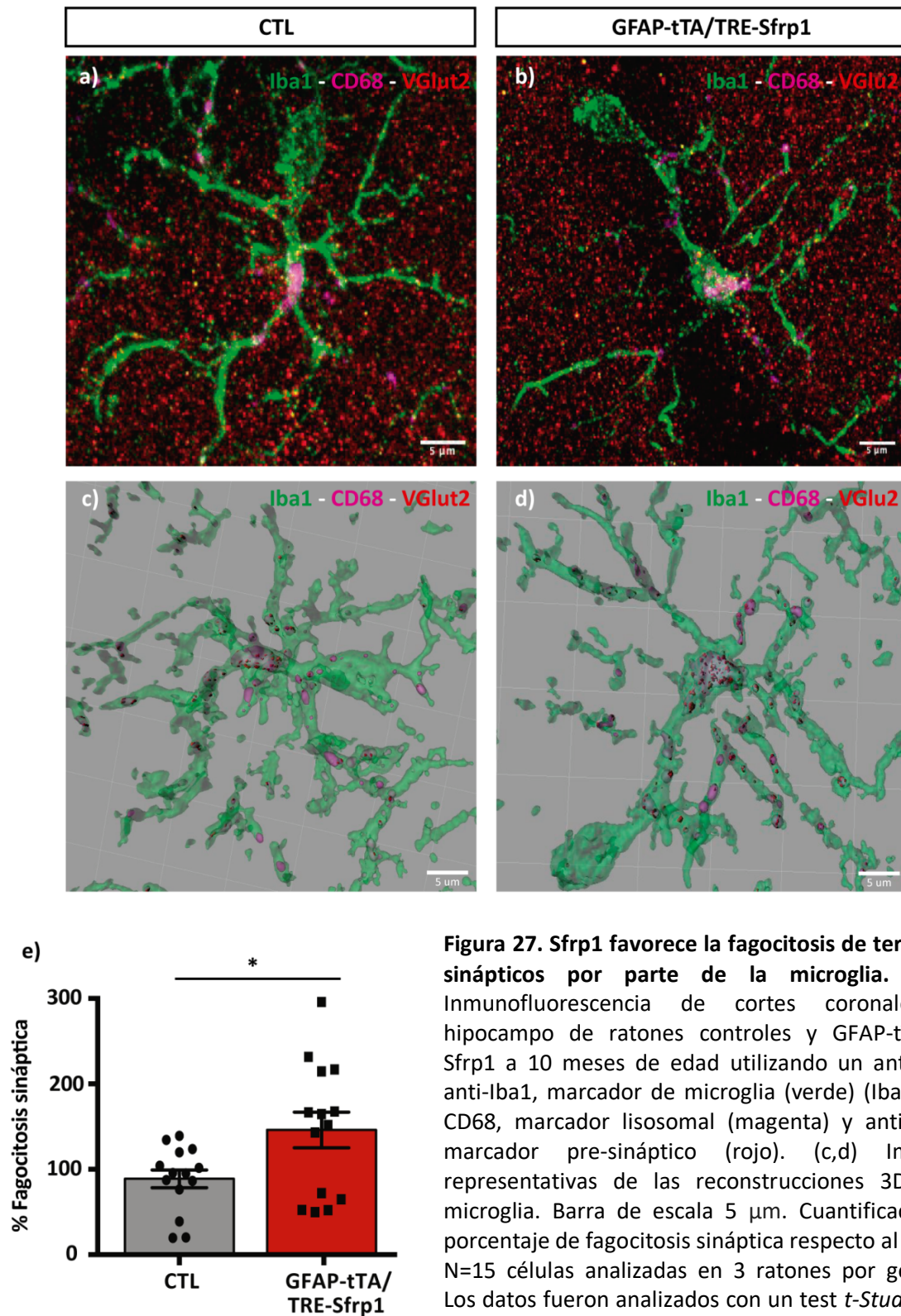


Figura 27. Sfrp1 favorece la fagocitosis de terminales sinápticos por parte de la microglia. (a, b) Inmunofluorescencia de cortes coronales del hipocampo de ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a 10 meses de edad utilizando un anticuerpo anti-Iba1, marcador de microglia (verde) (Iba1), anti-CD68, marcador lisosomal (magenta) y anti-Vglut2, marcador pre-sináptico (rojo). (c,d) Imágenes representativas de las reconstrucciones 3D de la microglia. Barra de escala 5 μ m. Cuantificación del porcentaje de fagocitosis sináptica respecto al control. N=15 células analizadas en 3 ratones por genotipo. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas: * p < 0,05.

3.6. Sfrp1 induce deterioro cognitivo y alteraciones comportamentales

Para determinar si las alteraciones encontradas por la sobre-expresión de Sfrp1 se asociaban a un deterioro cognitivo, llevamos a cabo una batería de pruebas de comportamiento en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 8-10 meses, cuando se observan alteraciones morfológicas y bioquímicas. Todas las pruebas de comportamiento están explicadas en el aparato 7 de Materiales y Métodos, acompañadas de un esquema sobre cómo fueron realizadas.

En primer lugar, sometimos a los ratones a una prueba de coordinación motora. Esta prueba mide la posible existencia de alteraciones en las habilidades motoras, cuantificando el tiempo durante el cual los ratones son capaces de mantenerse en movimiento encima del rotarod mientras éste aumenta su velocidad de forma progresiva. El análisis de los datos no mostró diferencias significativas entre los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 y los controles ni en machos (Figura 28a) ni en hembras (Figura 28b). Estos datos nos indican que la sobre-expresión de Sfrp1, al menos a esta edad, no afecta a la función motora de los ratones.

A continuación, analizamos posibles alteraciones comportamentales asociadas al envejecimiento y la EA, mediante dos ensayos diferentes: un test de socialización y el *Elevated Plus Maze* (EPM), el cual se utiliza para medir el nivel de ansiedad de los animales.

El test de socialización se basa en la preferencia de los ratones a pasar más tiempo con un ratón desconocido que con un objeto. Cuantificamos el tiempo que los ratones invertían en investigar una jaula vacía o una jaula con un ratón desconocido. Mediante este análisis pudimos observar que, mientras los ratones controles presentaban una clara preferencia por la jaula con el ratón desconocido, los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 apenas mostraban preferencias. Por lo tanto, estos datos nos indican que la sobre-expresión de Sfrp1 induce defectos en la sociabilidad de los ratones (Figura 28c).

En la prueba EPM, los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 también mostraron un comportamiento significativamente diferente frente a los ratones controles. Cuantificamos el tiempo que ratones invierten investigando el brazo abierto respecto al tiempo total de exploración del brazo abierto y el brazo cerrado (índice de exploración). El análisis de los

RESULTADOS

resultados mostró que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentaban un nivel de ansiedad más acusado que los ratones control, ya que invierten menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto (Figura 28d).

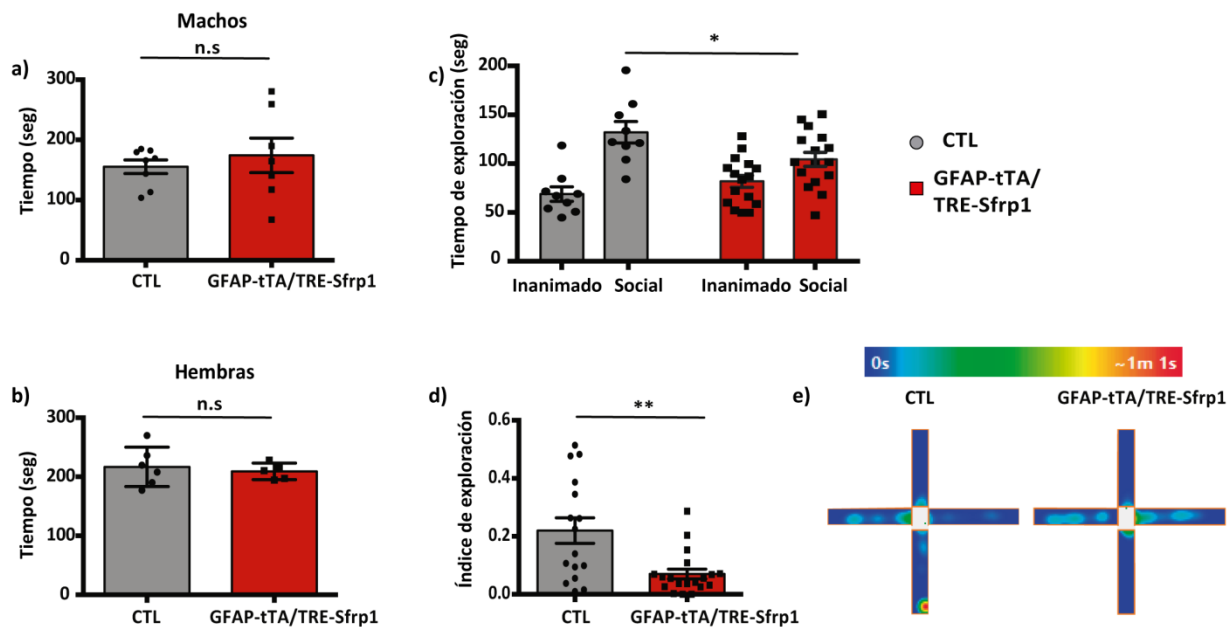


Figura 28. Sfrp1 causa alteraciones comportamentales. Cuantificación del test *Rotarod* en ratones machos (a) y hembras (b) a 8-10 meses de edad. La gráfica muestra el tiempo que los ratones consiguen mantenerse encima del *Rotarod* durante el test. N= 8 machos y 6 hembras control; N= 7 machos y 5 hembras GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (c) Test de socialización, cuantificación del tiempo que los ratones pasan interaccionando con una jaula vacía o con una jaula con un animal desconocido. N= 9 controles y N=16 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (d, e) Cuantificación de la ansiedad de los ratones mediante el test *Elevated Plus Maze*. (e) Cuantificación del índice de exploración del brazo abierto (tiempo en el brazo abierto/tiempo en el brazo abierto + tiempo en el brazo cerrado). (e) Esquema del movimiento de los ratones durante el test. N= 16 controles y N=19 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Los datos fueron analizados con un test *t-Student* para la prueba *Rotarod* y el *Elevated plus Maze*. La prueba socialización se analizó con un test *one-way ANOVA* seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * 0,05 > p ≥ 0,01; ** 0,01 > p ≥ 0,001; ns= no significativo.

Para analizar posibles alteraciones en la memoria de los ratones asociados a la sobre-expresión de Sfrp1, realizamos pruebas de comportamiento de memoria a corto plazo (*Y-maze* y el *Novel Object Localation Test*) y a largo plazo (*Object Recognition Test* y el *Contextual Fear conditioning*). En todas las pruebas se realiza un entrenamiento y una hora (en el caso de memoria a corto y plazo) o 24 horas (en el caso de memoria a largo plazo) los ratones fueron sometido al test.

El *Y-maze* es una prueba de memoria espacial dependiente de hipocampo, basado en la preferencia de los ratones por explorar nuevos ambientes. La cuantificación del porcentaje del tiempo que los ratones pasan explorando el brazo nuevo (derecho) frente al

tiempo total de exploración, es directamente proporcional a la capacidad de memoria espacial. El análisis de los datos reveló una disminución significativa en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 comparado con los ratones control tanto en machos (Figura 29a) como en hembras (Figura 29b).

Para comprobar si, al igual que pasaba con la neuroinflamación, el fenotipo era dependiente de los niveles de Sfrp1, repetimos el test Y-maze en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos comparados con ratones control a los 6 meses de edad. El análisis de los resultados mostró que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos presentaban significativamente menos memoria que los ratones control. Sin embargo, los ratones heterocigotos aún no mostraban ningún cambio. Estos datos sugieren que el índice de memoria también depende de los niveles de Sfrp1.

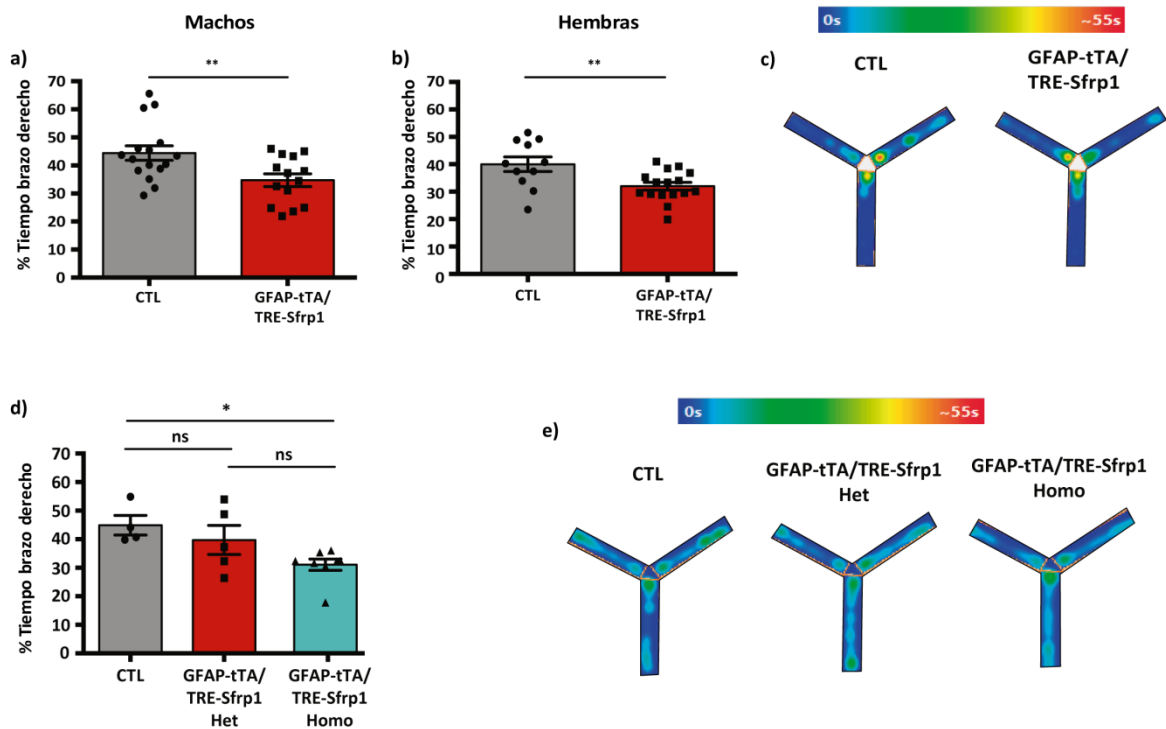


Figura 29. Sfrp1 reduce la memoria a corto plazo. Test de comportamiento Y-maze. Cuantificación del porcentaje de tiempo invertido en explorar el brazo desconocido (tiempo brazo derecho/tiempo brazo derecho + brazos conocidos) en machos (a) y hembras (b). (c) Imágenes representativas del movimiento de los ratones durante el test. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. N=16 machos y 11 hembras control y N=14 machos y 16 hembras GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos 8-10 meses. (d-e) Y-maze en ratones control, GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a 6 meses de edad. (d) Cuantificación del porcentaje de tiempo invertido en explorar el brazo desconocido (tiempo brazo derecho/tiempo brazo derecho + brazos conocidos). (e) Imágenes representativas del movimiento de los ratones durante el test. N=4 controles, N=6 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y N=7 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos. Los datos se analizaron con un test *one-way* ANOVA seguido

RESULTADOS

de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ns= no significativo.

El *Novel Object Location Test* se basa en la capacidad de formar patrones para diferenciar dos contextos muy similares, donde los ratones deberían ser capaces de reconocer si un objeto ha sido cambiado de lugar. El análisis de datos se llevó a cabo cuantificando el porcentaje de tiempo que los ratones invierten explorando el objeto situado en la nueva localización respecto al tiempo total de exploración (% índice de discriminación). Durante el entrenamiento, tanto los ratones control como los GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos pasan el mismo tiempo explorando ambos objetos (Figura 30a). Sin embargo, durante el test, los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 invierten significativamente menos tiempo que los controles explorando el objeto situado en la nueva localización (Figura 30b, c), indicando una pérdida de memoria.

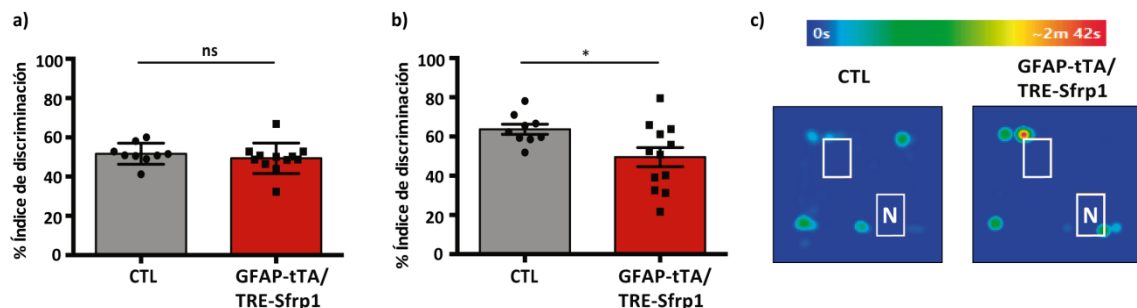


Figura 30. Sfrp1 reduce la memoria a corto plazo. Test de comportamiento *Novel Object Location Preference Test*. Cuantificación del porcentaje del índice de discriminación (tiempo objeto situado en la nueva posición/tiempo total de exploración) durante el día de entrenamiento (a) y durante el test (b). Imágenes representativas del movimiento de los ratones durante el test. N=8 controles y N=12 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos a los 8-10 meses. N= Nueva localización del objetivo. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ns= no significativo.

Para analizar la memoria a largo plazo, realizamos el *Object Recognition Test*, el cual se basa en la preferencia de los ratones a explorar nuevos objetos. Durante el entrenamiento, los ratones están expuestos a dos objetos exactamente iguales. En este periodo los ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos se comportaron de forma similar (Figura 31a). Durante el test, uno de los objetos se sustituye por otro completamente diferente y se cuantificó el porcentaje del tiempo que los ratones invierten en explorar el objeto nuevo respecto al tiempo total de exploración (% índice de exploración). En este caso, los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 pasaron significativamente menos tiempo con el objeto nuevo que los controles (Figura 31b, c).

Repetimos el *Object Recognition Test* en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos, heterocigotos y control a los 6 meses de edad. Los resultados mostraron que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos presentan niveles de exploración significativamente inferiores comparado con los controles, mientras que los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos aún no mostraban diferencias significativas (Figura 31d). Estos datos demuestran que existe una correlación positiva entre la dosis génica de Sfrp1 y la pérdida de memoria.

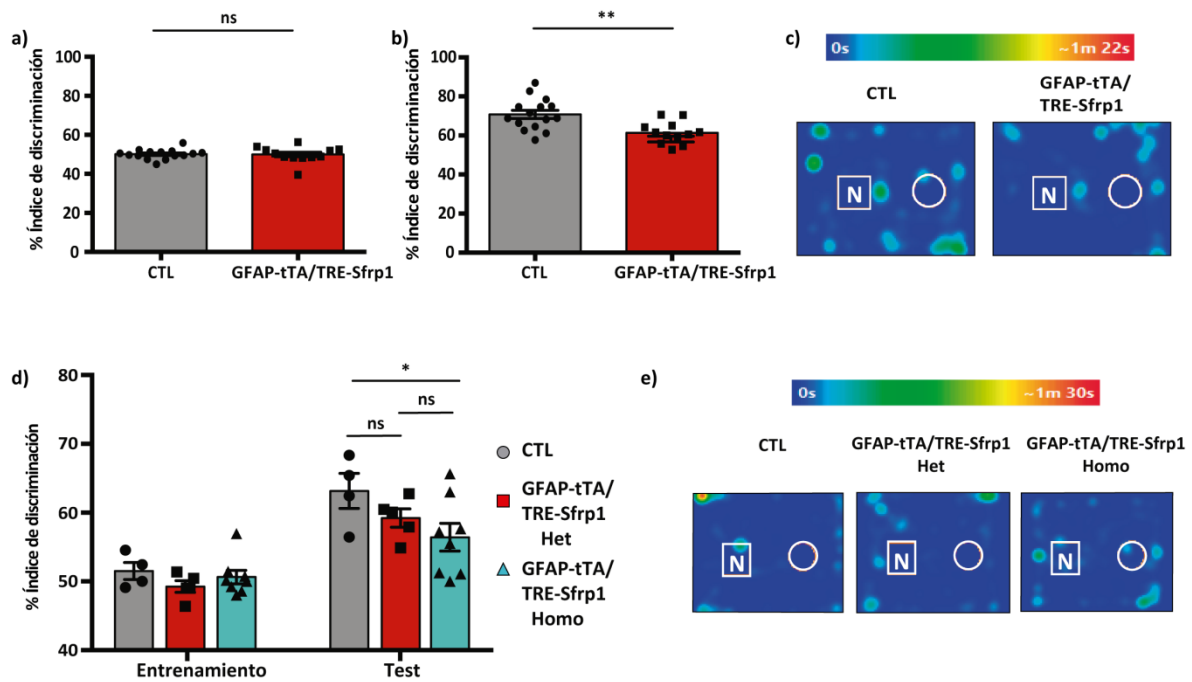


Figura 31. Sfrp1 reduce la memoria a largo plazo. (a-c) Test de comportamiento *Novel object recognition*. Cuantificación del porcentaje de índice de discriminación (tiempo explorando el nuevo objeto/tiempo total exploración) durante el entrenamiento (a) y el test (b). Imágenes representativas del movimiento de los ratones durante el test (c). N=15 controles y N=12 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 8-10 meses de edad. Los datos fueron analizados con un test *t-Student*. (d) *Novel Location Preference Test* en ratones control, GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y homocigotos a 6 meses de edad. (d) Cuantificación del porcentaje de índice de discriminación (tiempo explorando el nuevo objeto/tiempo total exploración) durante el entrenamiento y el test. (e) Imágenes representativas del movimiento de los ratones durante el test. N=5 controles, N=6 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y N=7 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 homocigotos. Los datos se analizaron con un test *one-way ANOVA* seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * 0,05 > p ≥ 0,01; ** 0,01 > p ≥ 0,001; ns= no significativo. N = nuevo objeto

RESULTADOS

El test *Contextual Fear conditioning* es una prueba de memoria asociativa y aprendizaje donde se asocia un estímulo aversivo (descarga eléctrica) con un estímulo neutro (el ambiente) el cual provoca en el ratón una respuesta de miedo en forma de una paralización completa. Los ratones se introducen en la caja y son libres para explorar el ambiente durante 150 segundos, tanto ratones controles como GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos, invierten la mayor parte del tiempo en explorar la caja (Figura 32a). Pasado ese tiempo los ratones comenzaron a recibir una descarga eléctrica por minuto y empiezan a desarrollar una respuesta de miedo (paralización) que va aumentando con el número de descargas eléctricas (Figura 32b). El análisis de los resultados no mostró diferencias entre los ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 durante el entrenamiento. Al día siguiente, los ratones fueron introducidos en la misma caja, pero esta vez sin ninguna descarga eléctrica. Si los ratones eran capaces de recordar el contexto donde se realizó el entrenamiento, mostrarían una respuesta de miedo al acordarse de la descarga eléctrica sufrida. Cuantificamos el porcentaje de tiempo que los ratones pasan paralizados por el miedo (Figura 32c) o el porcentaje de paralización total durante el test (Figura 32d). A pesar de que el número de animales utilizados fue muy reducido, observamos una disminución significativa en el tiempo de paralización en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 en comparación con los controles, indicando una disminución en la memoria asociativa.

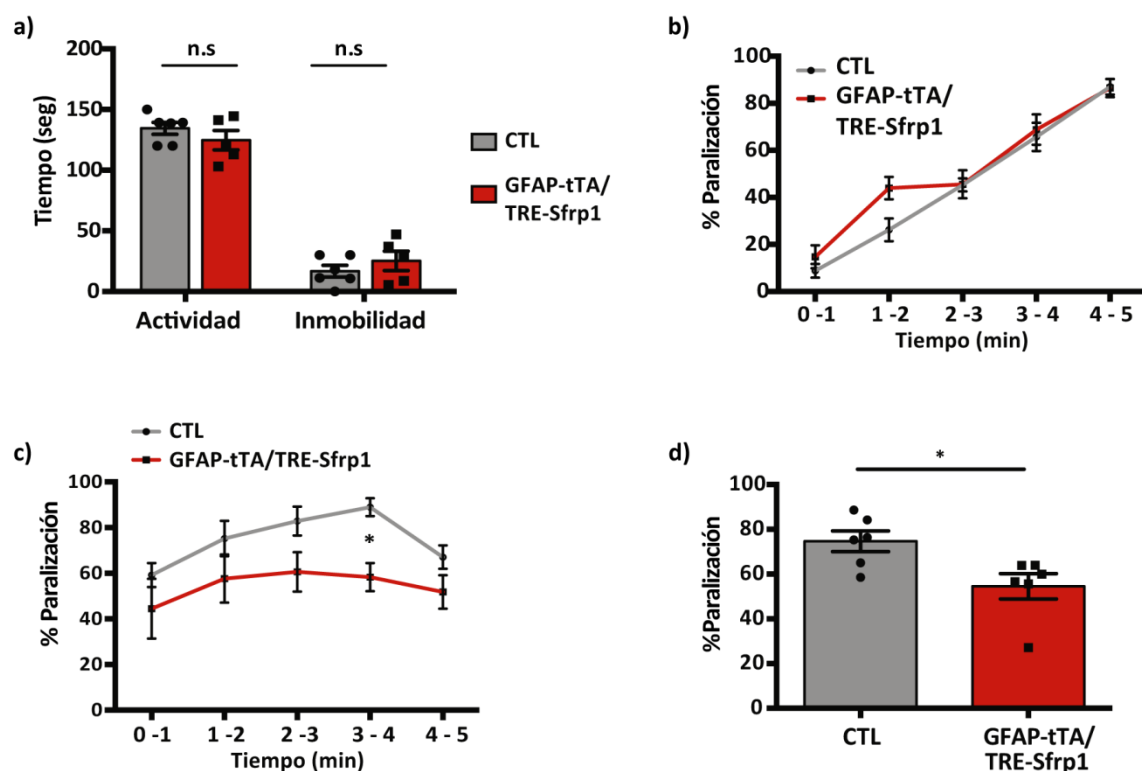


Figura 32. Sfrp1 reduce la memoria a largo plazo. Test de comportamiento Contextual *Fear conditioning*. (a) Cuantificación del tiempo de actividad e inmovilidad durante el tiempo de habituación. (b) Tiempo de paralización durante el entrenamiento mientras reciben las descargas eléctricas cada 60 segundos. (c) Tiempo de paralización durante el test representado por minutos. (g) Porcentaje total de tiempo que los ratones pasan paralizados a los 8-10 meses de edad. N=6 controles y N=6 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a los 8-10 meses de edad. Los datos fueron analizados con un test *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni, menos la gráfica (d) que se realizó un test *t-Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ns, no significativo.

En su conjunto, las pruebas de comportamiento nos indican que la sobre-expresión de Sfrp1 en cerebro es capaz de inducir una disminución en las capacidades cognitivas de los ratones, así como alteraciones en su comportamiento (social y ansiedad). Además, es importante destacar que la pérdida de memoria inducida por Sfrp1 es independiente del género. Finalmente, las pruebas realizadas en ratones homocigotos nos indicaron que la pérdida de memoria es dependiente de los niveles de Sfrp1, cuanto más Sfrp1 más temprano y más grave es el deterioro cognitivo.

3.7. Sfrp1 induce alteraciones en la expresión génica

Hasta ahora, hemos podido observar que la sobre-expresión de Sfrp1 es capaz de inducir neuroinflamación y alteraciones sinápticas que conducen a una disminución de las capacidades cognitivas. Estas son algunas de las características más comunes del envejecimiento y la EA. Además, estos cambios suelen ir asociados con alteraciones en la expresión génica (Bishop et al., 2010).

Analizamos la expresión de 8 genes que codifican para proteínas con funciones muy distintas y cuya alteración se ha correlacionado con la EA: *GRN* (progranulina) (Chitramuthu et al., 2017); *FOXO3A* (Maiese, 2017), *PIN1* (peptidilpropil cis/trans isomerasa) (Driver and Lu, 2010), *BLVRA* (biliverdina reductasa A) (Barone et al., 2011), *HSF1* (Hooper et al., 2016), TMEM106b (Debaisieux and Schiavo, 2014), CYP46A1 (Martin et al., 2014) y Neuroglobina (Sun et al., 2005, Sun et al., 2013).

El análisis de los niveles de mRNA por PCR cuantitativa en la corteza de ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 a lo 8 meses de edad, reveló una disminución significativa de la expresión de tres de los genes, TMEM106b, CYP46a1 y Neuroglobina (Figura 33).

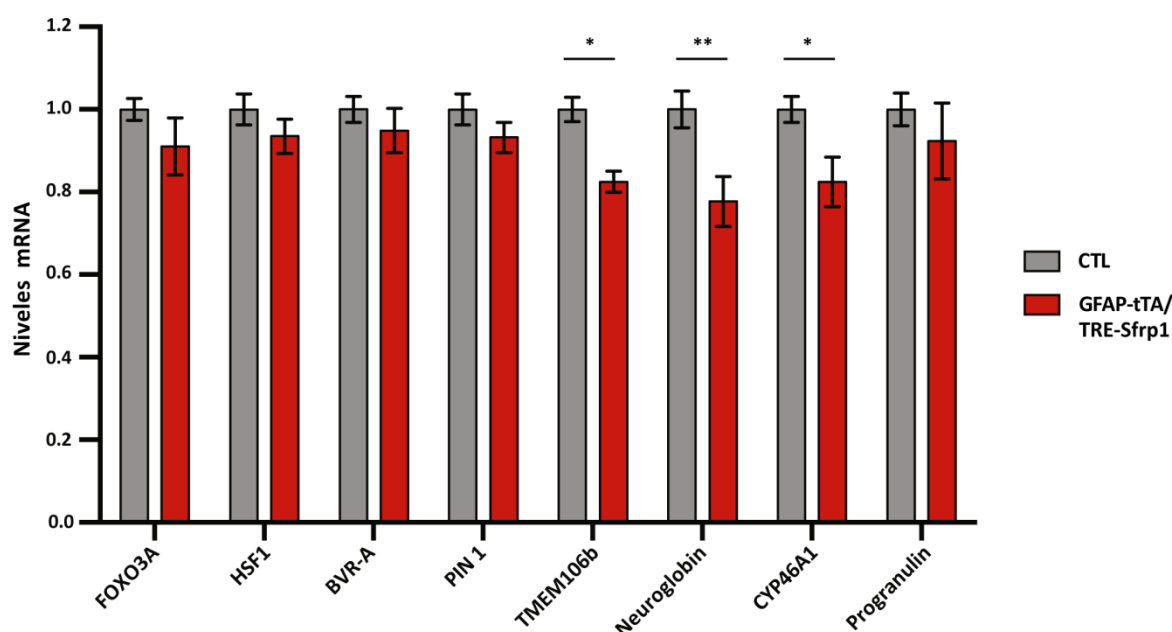


Figura 33. Sfrp1 disminuye los niveles de expresión de distintos genes relacionados con la EA. Cuantificación de los niveles de mRNA de corteza de ratones controles (n=10) y ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (n=6) a 10 meses de edad. Los datos fueron analizados con test *one-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ** $0,001 > p \geq 0,001$; ns, no significativo.

4. La combinación de Sfrp1 y un factor de riesgo para el envejecimiento, como es la obesidad, no agrava el deterioro cognitivo

Como hemos explicado en la introducción, el estilo de vida es un factor que puede contribuir positiva o negativamente con el deterioro cognitivo durante el envejecimiento. La obesidad es uno de los factores que contribuye con la atrofia cerebral y está asociada a una inflamación crónica de bajo grado (Mattson and Arumugam, 2018). Además, es uno de los factores de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentra la EA (Alford et al., 2018). Por ello, nos planteamos si, la obesidad podría agravar el fenotipo asociado a la sobre-expresión de Sfrp1 en el cerebro.

Administramos a los ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos una dieta alta en grasa (DAG) durante 22 semanas comenzando a los 6 meses de edad. Durante el ensayo comparamos ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 con dieta alta en grasa y ratones controles y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 con su dieta normal para poder valorar el posible efecto de la dieta grasa sobre cada genotipo.

Hicimos un seguimiento semanal del peso corporal, donde observamos que los ratones con dieta grasa empezaron a aumentar su peso a partir de la segunda semana (Figura 34a), siendo significativo a partir de la quinta semana en comparación con ratones del mismo genotipo con dieta control. Una de las características de la obesidad, es que va acompañado de una hiperglucemia. Medimos los niveles de glucosa en sangre y observamos un aumento significativo en los ratones con dieta grasa comparado con ratones con dieta control (Figura 34b). Con estos datos, pudimos concluir que la dieta alta en grasa realmente estaba induciendo obesidad tanto en los ratones control como en los GFAP-tTA/TRE-Sfrp1, por lo que procedimos al estudio del posible efecto que podría ejercer sobre la memoria.

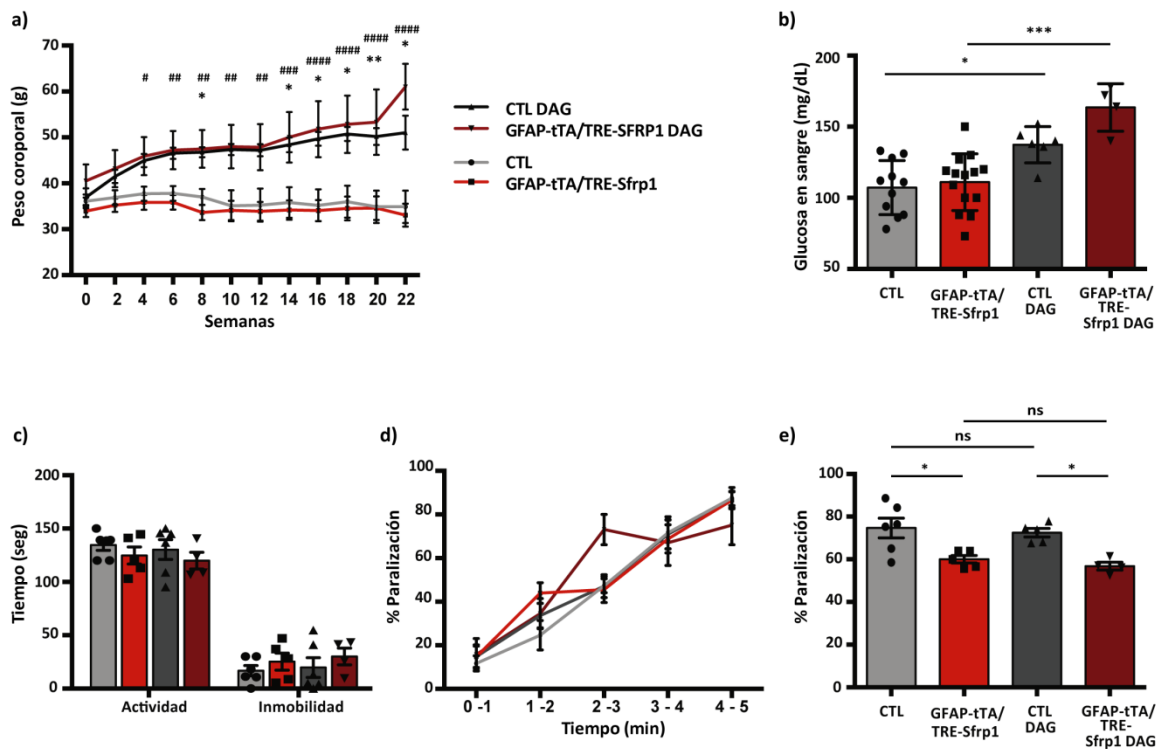


Figura 34. La administración de dieta alta en grasa no agrava la pérdida cognitiva de los ratones GFAP-tTA/Sfrp1-tetO. (a) La gráfica representa la media del peso corporal en los grupos con dieta control de ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos y el grupo con dieta alta en grasa de los ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. No hay diferencias significativas entre los genotipos pero sí entre las dietas. (b) Cuantificación de los niveles de glucosa en sangre de los diferentes grupos de edad al finalizar las 22 semanas de dieta. (c-e) Test de comportamiento *Contextual Fear Conditioning* (c). Cuantificación del tiempo de actividad e inmovilidad de los ratones de los distintos grupos experimentales durante el tiempo de habituación. (d) Cuantificación del tiempo de paralización durante el entrenamiento mientras reciben las descargas eléctricas cada 60 segundos. (e) Cuantificación del porcentaje de tiempo total que los distintos grupos experimentales permanecen paralizados durante el test. El símbolo * hace referencia a las diferencias significativas en el grupo control y el grupo control con dieta grasa. El símbolo # hace referencia a las diferencias significativas entre los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 con dieta grasa. Dieta control; N= 6

RESULTADOS

controles y N=5 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1; Dieta alta en grasa; N=5 controles y N=4 GFAP-tTA/TRE-Sfrp1. Los datos fueron analizados con el test *one-way* o *two-way* ANOVA seguido de un test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas: * $0,05 > p \geq 0,01$; ** $0,001 > p \geq 0,001$; *** $0,001 > p \geq 0,0001$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo.

Cuantificamos la capacidad cognitiva de los ratones con dieta grasa mediante la prueba de *Contextual Fear Conditioning*. Durante el periodo de habituación tanto los ratones con dieta grasa como dieta control pasaron la mayor parte del tiempo explorando la caja (Figura 34c). Además, cuando empezaron las descargas eléctricas, los cuatro grupos de ratones comenzaron a presentar una respuesta en forma de miedo, evidenciada por una paralización, que aumenta con el número de descargas. El análisis de los datos correspondiente al entrenamiento no mostró diferencias entre los distintos genotipos y dietas. Al día siguiente realizamos el test, donde observamos diferencias significativas en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 frente a los controles, pero ninguna diferencia entre las distintas dietas (Figura 34d-e).

A pesar de que el número de ratones utilizado en este ensayo fue muy pequeño, pudimos concluir que una dieta alta en grasa, al menos a las 22 semanas de administración en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos, no agrava la pérdida de memoria asociada a la sobre-expresión de Sfrp1.

DISCUSIÓN

El envejecimiento cerebral es un proceso multifactorial causado por la acumulación progresiva de daños moleculares y celulares, que conducen a un progresivo deterioro cognitivo y pérdida en la percepción sensorial (Yankner et al., 2008). Además, es el principal factor de riesgo para la aparición de distintas enfermedades neurodegenerativas como la EA, cuya incidencia ha aumentado de forma preocupante en los últimos años. Muchos de los compuestos que se han llevado a la fase clínica, han ido dirigidos a reducir la carga del péptido β amiloide en cerebro. Según la hipótesis de la cascada amiloide, este péptido tiene un papel fundamental en la pérdida neuronal durante la progresión de la enfermedad, debido a la toxicidad de los oligómeros que genera (Hardy and Selkoe, 2002). Aunque algunas de estas moléculas, en su mayoría anticuerpos neutralizantes del péptido β amiloide o moléculas inhibidoras de β o γ secretasa han logrado disminuir el número de placas amiloides, ninguno ha conseguido frenar el progresivo deterioro cognitivo que sufren los pacientes de EA (Sevigny et al., 2016). Con estas premisas, parece necesario cambiar el foco de estudio e identificar nuevos factores relacionados con la EA, que nos permitan generar otras dianas terapéuticas contra la enfermedad.

En esta tesis, hemos demostrado que, con el envejecimiento, un aumento en la expresión de la proteína Sfrp1 es capaz de inducir neuroinflamación. Esta se caracteriza por la activación de las células gliales, produciendo astrogliosis y microgliosis, un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de vías relacionadas con la inflamación, como MAPK/p38. La inflamación inducida por Sfrp1 podría ser, en parte, responsable de la disminución del número de sinapsis y de la densidad de las espinas dendríticas. La combinación de estos factores está asociada a un deterioro cognitivo, representado por la pérdida progresiva de la memoria tanto a corto como a largo plazo y alteraciones comportamentales que incluyen un aumento en la ansiedad y una disminución en la interacción social. Todas estas características están presentes tanto en el envejecimiento, como en la EA (Mattson and Arumugam, 2018, Selkoe and Hardy, 2016, Krell-Roesch et al., 2016). Además, hemos demostrado que las alteraciones producidas por elevados niveles de Sfrp1 son dependientes del tiempo y de la concentración de la proteína, es decir, niveles más elevados de Sfrp1 correlacionan con alteraciones más evidentes y tempranas.

1. Función patológica de la proteína Sfrp1 en el cerebro

Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la inhibición génica de *Sfrp1* o su neutralización con un anticuerpo específico contra *Sfrp1* en ratones APP;PS1, disminuyen los signos histo-patológicos de la neurodegeneración como la acumulación de placas amiloides y la inflamación. Además, previene la pérdida cognitiva y plasticidad sináptica características de la EA (Esteve et al., 2019b). Estos datos fueron los que motivaron nuestro estudio, donde postulamos que altos niveles de *Sfrp1*, al margen del acúmulo de A β , podrían tener un papel patológico en el cerebro. En apoyo a nuestra hipótesis y a nuestros resultados, estudios recientes han identificado que el mRNAs de *SFRP1* se encuentra incrementado en extractos cerebrales humanos durante el envejecimiento y en la EA desde los primeros estadios de la enfermedad (Folke et al., 2019, Blalock et al., 2004, Esteve et al., 2019b). Los astrocitos parecen ser los responsables de la expresión de *SFRP1* (Esteve et al., 2019b, Clarke et al., 2018) ya que, durante el envejecimiento, al menos en ratón, se ha demostrado que aumentan los niveles de mRNA hasta 3 veces. Nuestros datos muestran que la sobre-expresión de *Sfrp1* en astrocitos induce neuroinflamación, caracterizada por la activación de las células microgliales y astrocitos, y vías de señalización asociadas como la MAPK/p38. Además, esta activación es más severa y temprana a medida que se incrementan los niveles de *Sfrp1*, lo cual podría explicarse por su función como inductor de senescencia (Elzi et al., 2012).

La senescencia celular es un proceso fisiológico presente de una forma muy abundante en tejidos y órganos envejecidos (Campisi, 2013, Childs et al., 2017). Las células senescentes se caracterizan por secretar un conjunto de proteínas conocidas como SASP, que generan una inflamación en el microambiente tisular conduciendo a un deterioro funcional (Campisi, 2013). Dentro de las SASP se incluye la proteína *Sfrp1* y citoquinas pro-inflamatorias, por ejemplo TNF α (Gosselin and Rivest, 2018), la cual hemos visto aumentada tras la sobre-expresión de *Sfrp1* en el cerebro. Se ha demostrado que, *in vivo*, los niveles *SFRP1* se encuentran incrementados en distintos nichos de células madre humanas envejecidas, como en las células cardíacas (Nakamura et al., 2017), el timo senescente (Ferrando-Martinez et al., 2015), el folículo piloso (Hawkshaw et al., 2018), así como en la red trabecular del ojo en casos de glaucoma (Morgan et al., 2015). Además, *Sfrp1* es

necesaria y suficiente para inducir senescencia *in vitro* en distintos tipos celulares, como células epiteliales y fibroblastos humanos (Elzi et al., 2012), células cardíacas (Nakamura et al., 2017) y células de la red trabecular del ojo (Morgan et al., 2015).

Ya que los niveles de SFRP1 aumentan durante el envejecimiento, y es capaz de inducir senescencia, parece bastante plausible que SFRP1 ejerza esta misma función en el cerebro. Recientemente se ha demostrado que las células gliales presentan signos de senescencia en distintos modelos murinos de neurodegeneración. Además, la eliminación de estas células mediante tratamientos con senolíticos, disminuye la inflamación y previene el deterioro cognitivo asociado a estos ratones, demostrando la importancia de estas células en procesos patológicos (Zhang et al., 2019, Bussian et al., 2018, Gosselin and Rivest, 2018, Chinta et al., 2018).

Basándonos en estos datos, nos planteamos si altos niveles de Sfrp1 en el cerebro serían capaces de inducir por si mismos senescencia. La senescencia está asociada al aumento de la expresión de diversas proteínas como p21, p16, p38 MAPK y en la actividad de SA-βGal entre otros (Althubiti et al., 2014, Campisi, 2013). Diversos estímulos, como pueden ser el estrés oxidativo o metabólico, daño en el ADN, citoquinas o mediadores de inflamatorios, son capaces de activar la vía de señalización de la MAPK p38 (Salminen et al., 2012). Se ha demostrado que p38 es un importante inductor de senescencia celular, capaz de activar la detención de la proliferación celular mediada por p53 o pRB (Maruyama et al., 2009, Deng et al., 2004). La sobre-expresión de Sfrp1 reveló un aumento en los niveles de fosforilación de p38, indicativo de un aumento en su actividad. Además, experimentos muy preliminares mostraron que la sobre-expresión de Sfrp1 también inducía un incremento del marcador de senescencia SA-βGal en hipocampo a los 8 meses de edad. En su conjunto, estos datos sugieren que el fenotipo observado por la sobre-expresión de Sfrp1 podría ser la consecuencia de su posible función como inductor de senescencia en el cerebro. Apoyando esta hipótesis, estudios previos demostraron la causalidad entre SFRP1, senescencia y glaucoma, una patología neurodegenerativa con algunas similitudes a la EA (Wang et al., 2008, Morgan et al., 2015). Sin embargo, ensayos adicionales, como la cuantificación de los niveles de expresión de p21 y p16, proteínas inhibidoras del ciclo celular, son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Las funciones cognitivas disminuyen durante el envejecimiento y terminan siendo casi nulas en la EA (Avila et al., 2017). Estas alteraciones están asociadas a la pérdida de la integridad neuronal, interfiriendo en la arquitectura dendrítica y función sináptica (Dickstein et al., 2007, Avila et al., 2017). Nuestros experimentos han demostrado que Sfrp1 está presente en preparaciones de sinaptosomas, sugiriendo que podría tener una función directa sobre la sinapsis. Esta hipótesis se sustenta en el hecho que Sfrp1 es capaz de modular tanto la señalización de Wnt (Bovolenta et al., 2008) como la actividad proteolítica de ADAM10 (Esteve et al., 2011a) y ambas vías están implicadas en la formación y remodelación de las sinapsis (Budnik and Salinas, 2011, Prox et al., 2013).

En línea con la inhibición directa de la vía de Wnt, varios estudios describen cómo inyecciones locales de Sfrp1 en la región CA3 del hipocampo alteran la plasticidad sináptica (Gogolla et al., 2009). Además, la adicción de Sfrp1 en cultivos neuronales de hipocampo provoca una regresión en la arborización dendrítica. Mientras que Wnt7 aumenta la arborización dendrítica e induce la formación de ramas más complejas, la adicción de Sfrp1 induce el efecto opuesto *in vitro* (Rosso et al., 2005, Hiester et al., 2013, Xu et al., 2015, Gogolla et al., 2009).

Nuestros datos demuestran que un incremento de los niveles de Sfrp1 (similares a los encontrados en ratones APP;PS1) en un modelo *in vivo*, y no en un sistema *in vitro*, disminuye el número de sinapsis excitatorias, reduce la complejidad del árbol dendrítico y finalmente el número de las espinas dendríticas en la región hipocampal (Figura 35). La morfología de las espinas dendríticas es fundamental para una correcta función sináptica. Estas son estructuras muy plásticas que emergen con una forma alargada (*thin*) y según van madurando se retraen y aumentan el tamaño de su cabeza, convirtiéndose en espinas tipo *mushroom* (Hiester et al., 2013). Varios estudios apuntan a que las espinas *thin* son las más vulnerables al envejecimiento y desaparecen con mayor rapidez, dificultando la capacidad de adquirir nueva información (Dumitriu et al., 2010). Sin embargo, nuestros datos muestran un aumento en el porcentaje de espinas *thin* y alteraciones en la morfología de las espinas *mushroom*.

Las espinas *mushroom* observadas en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 presentan una forma que recuerda a las espinas *thin*, más alargadas y una cabeza más pequeña (Figura 35),

lo cual correlaciona con una fuerza sináptica menor (Kasai et al., 2003). Las espinas *mushroom* están relacionadas con el almacenaje de la memoria (van der Zee, 2015), por lo que un cambio en su morfología asociado a la disminución en el número total de espinas dendríticas explicaría el deterioro cognitivo que sufren los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 al sobre-expresar la proteína Sfrp1. Nuestro análisis de momento es limitado en el tiempo y no sabemos cual será la progresión de las alteraciones de las espinas dendríticas en etapas más tardías o con dosis mayores de Sfrp1. Por lo tanto, es difícil predecir el significado preciso de estos cambios desde un punto de vista funcional.

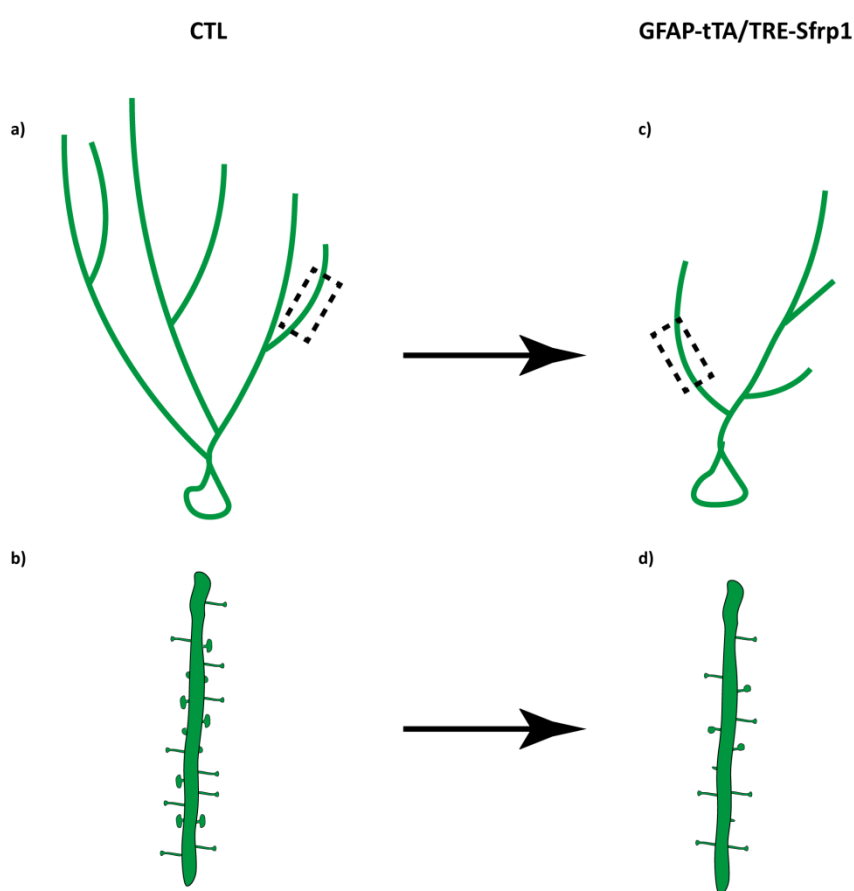


Figura 35. Modelo propuesto de las alteraciones morfológicas en las neuronas hipocampales como consecuencia de la sobre-expresión de Sfrp1. Representación de la disminución del árbol dendrítico en ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (a-b). Los recuadros representan la amplificación de una segmento dendrítico que nos permite visualizar la pérdida y alteración de la morfología de las espinas dendríticas en los ratones control y GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 (b-d) a los 8 meses.

Una posible explicación a la disminución de las espinas y densidad sináptica que observamos en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1, en parte, podría deberse a que la activación de la microglia indujera un aumento en la poda sináptica. Este es un proceso por el cual la

microglia se encarga de remodelar las conexiones sinápticas. En los últimos años se ha prestado más atención a su posible función durante eventos patológicos como la EA o la esquizofrenia, donde la activación de la microglia podría ir ligada al aumento descontrolado de la fagocitosis sináptica, disminuyendo el número de espinas dendríticas, y como consecuencia la pérdida de memoria (Hong et al., 2016, Sellgren et al., 2019). Nuestros datos, aunque son muy preliminares por el pequeño número de células analizadas, indican un aumento en la poda sináptica mediada por la microglia, que podría ser el responsable de la disminución del número de sinapsis. Estudios más extensos son necesarios para demostrar la relación directa entre la activación de la microglia y la disminución de espinas dendríticas cuando se sobre-expresa *Sfrp1 in vivo*.

2. Posible mecanismo molecular de Sfrp1

Sfrp1 es una proteína multifuncional y extracelular, que participa en la comunicación célula-célula (Bovolenta et al., 2008). Las alteraciones observadas en los ratones transgénicos GFAP-tTA/TRE-*Sfrp1* podrían explicarse de distintas formas, no necesariamente excluyentes entre sí: **1)** modulando la vía de señalización de Wnt; **2)** regulando negativamente la actividad proteolítica de la metaloproteasa ADAM10; **3)** interaccionando con un receptor aún no identificado.

Estudios previos han demostrado que *Sfrp1* modula la señalización de la vía de Wnt de manera positiva o negativa (Esteve and Bovolenta, 2010). La señalización de Wnt tiene funciones muy importantes durante el desarrollo, y en el cerebro adulto juega un papel muy importante en la transmisión y estabilidad sináptica (Budnik and Salinas, 2011, Rosso and Inestrosa, 2013). La inhibición de la señalización por antagonistas de Wnt, mediante la adicción de *Sfrps* o *Dkk1*, inhibidor de la vía de Wnt por su unión a los correceptores LRP5/6, reducen la transmisión sináptica en cultivos neuronales (Cerpa et al., 2011, Ciani et al., 2015). Ya que el fallo sináptico es uno de los eventos más tempranos de la EA, múltiples estudios han establecido una relación entre la vía de Wnt y la EA, demostrando que la disminución en la señalización de esta vía se relaciona con la patogénesis de la enfermedad (Purro et al., 2014, Buechler and Salinas, 2018, Tapia-Rojas and Inestrosa, 2018). Por ejemplo, se ha observado un incremento en los niveles de *Dkk1* en extractos cerebrales de pacientes de EA (Caricasole et al., 2004). En un modelo animal, la sobre-expresión de *Dkk1* induce

alteraciones en la plasticidad, pérdida sináptica y como consecuencia, déficits cognitivo (Marzo et al., 2016).

Basándonos en estas premisas, nos planteamos si, a nivel molecular, el fenotipo observado por la sobre-expresión de *Sfrp1*, podría ser consecuencia de alteraciones en la vía de Wnt, por el secuestro de Wnts en el espacio extracelular o por la interacción con el receptor Frizzled. El análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de los genes diana y efectores de la vía de Wnt, *Axina2* y *Jun* (Gan et al., 2008, MacDonald et al., 2009), no mostraron diferencias significativas entre los extractos cerebrales procedentes de los ratones control y GFAP-tTA/TRE-*Sfrp1*. Por lo tanto, probablemente la vía de Wnt no esté contribuyendo al fenotipo inducido por la sobreexpresión de *Sfrp1* en el cerebro.

Otro mecanismo por el cual *Sfrp1* podría estar induciendo inflamación y pérdida sináptica sería regulando negativamente la actividad proteolítica de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). De hecho, se ha demostrado que la desregulación de ADAM10 está implicada en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos (Saftig and Bovolenta, 2015). Estudios del laboratorio han demostrado que *Sfrp1* disminuye la proteólisis de varios sustratos de ADAM10 como N-cadherina, L1 y APP (Esteve et al., 2011a, Marcos et al., 2015). Por lo tanto, es razonable pensar que una regulación similar pueda ocurrir con otros sustratos de ADAM10 como CX3CL1 (Hundhausen et al., 2007) o TREM2 (Kleinberger et al., 2014), los cuales tienen un papel fundamental en la activación de las células microgliales tras un daño (Linnartz and Neumann, 2013). Además, estudios recientes han demostrado que la falta de función de ADAM10 aumenta la respuesta neuroinflamatoria (Zhu et al., 2018, Prox et al., 2013). En concordancia, datos del laboratorio indican que ratones nulos para *Sfrp1* presentan una respuesta muy disminuida ante un estímulo pro-inflamatorio mientras que un estímulo pro-inflamatorio induce la expresión de *Sfrp1* (Rueda et al, en preparación). En su conjunto, estos datos sugieren que la actividad de *Sfrp1* es necesaria durante la respuesta inflamatoria, aunque no sabemos en que punto de la cascada inflamatoria actúa *Sfrp1*.

Por otro lado, ADAM10 modula procesos de memoria y aprendizaje, regulando la fuerza sináptica y su estabilidad (Prox et al., 2013, Marcello et al., 2017) mediante la proteólisis de proteínas de adhesión, como N-cadherina (Malinverno et al., 2010) y neuroligina 1 (Suzuki et al., 2012). Estas proteínas están presentes en la membrana de los

componentes sinápticos y alteraciones en su expresión están relacionadas con varios trastornos cognitivos como autismo, déficit cognitivo, esquizofrenia o Alzheimer (Sudhof, 2008, Ando et al., 2011). De hecho, la sobreexpresión de ADAM10 está asociada con un aumento en la densidad de los botones pre-sinápticos (Bell et al., 2008), mientras que la disminución de la actividad de ADAM10 correlaciona con la pérdida de sinapsis (Sudhof, 2008, Togashi et al., 2002, Prox et al., 2013).

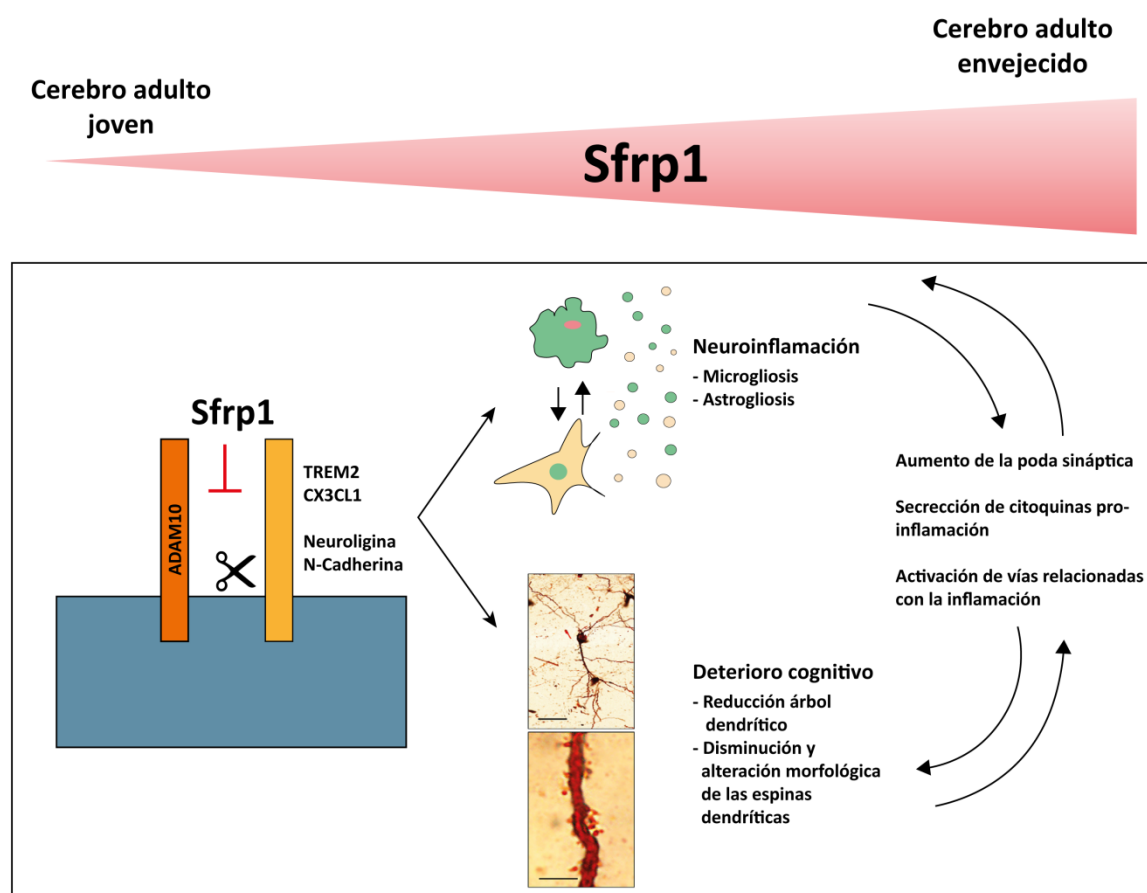


Figura 36. Modelo propuesto del mecanismo molecular de Sfrp1. Estudios previos del laboratorio han demostrado que Sfrp1 modula negativamente la actividad de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). Con el envejecimiento y la EA los niveles de Sfrp1 aumentan, lo cual disminuiría la actividad de ADAM10, afectando a la proteólisis de sus diversos sustratos, algunos implicados en inflamación (TREM2, CX3CL1) o plasticidad sináptica (Neuroligina o N-Cadherina). La desregulación de estos sustratos conduciría a una neuroinflamación y alteraciones sinápticas, y en su conjunto, a un deterioro cognitivo tal y como observamos en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1.

Los resultados obtenidos en esta tesis, junto con observaciones previas del laboratorio (Esteve et al., 2019), han demostrado la presencia e interacción de Sfrp1 y ADAM10 en sinaptosomas, apoyando la idea de una función directa de Sfrp1 a nivel sináptico. Sin embargo, en los sinaptosomas derivados de los ratones transgénicos GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 heterocigotos, no observamos diferencias en el procesamiento de N-

cadherina. Esto tal vez se deba a que las diferencias regionales en la expresión de Sfrp1 en los extractos de cerebro total utilizados en este experimento, podrían enmascarar las posibles diferencias en el procesamiento. De hecho, la sobre-expresión de Sfrp1 ocurre de forma más abundante en la región hipocámpal e hipotalámica, que son las regiones donde nos centraremos en los próximos experimentos.

Con los datos obtenidos durante esta tesis no podemos favorecer uno de los mecanismos explicados anteriormente o descartar la existencias de alguno que aún no hemos identificado. Sin embargo, poniendo en común todos los datos del laboratorio junto con la bibliografía disponible, nosotros consideramos que la modulación negativa de ADAM10 tiene un papel muy importante (Figura 36).

3. Sfrp1 como diana terapéutica contra la EA

La alta incidencia de la EA y el pronóstico de su aumento en los próximos años, resalta la necesidad de desarrollar algún tratamiento capaz de frenar la progresión de la enfermedad, así como métodos de detección temprana, ya que cuando la enfermedad muestra los primeros síntomas, los cambios moleculares que se han producido en el cerebro ya son irreversibles.

Se han desarrollado múltiples tratamientos para la EA como inhibidores de la colinesterasa, antagonista del receptor NMDA (Klafki et al., 2006, Mangialasche et al., 2010) y anticuerpos no específicos IgG o específicos contra A β . Sin embargo, hasta el momento, ninguno ha tenido éxito frenando la progresión de la enfermedad (Lunemann et al., 2015, Sevigny et al., 2016).

Nuestros resultados abren la puerta a explorar si la utilización de un anticuerpo que neutralice la actividad de Sfrp1 pueda tener un beneficio terapéutico para mejorar o al menos ralentizar la progresión de la enfermedad. El posible efecto de esta terapia sería múltiple, ya que no iría únicamente dirigida a disminuir la carga A β , sino que también reduciría la neuroinflamación y sus consecuencias, así como la pérdida sináptica que encontramos durante la EA (Selkoe and Hardy, 2016). Además, Sfrp1 también se asocia con alteraciones en la expresión de mRNA de genes que se encuentran alterados en pacientes

con EA, como CYP46A1, TMEM106b y Neuroglobina. Estas proteínas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis cerebral. Alteraciones en su expresión se relacionan con la desregulación metabólica del colesterol (Martin et al., 2014), de los lisosomas (Satoh et al., 2014) o el sistema REDOX (Szymanski et al., 2010) respectivamente. Todas estas características conducen hacia un progresivo deterioro cognitivo, por lo que la neutralización de la proteína Sfrp1 actuaría de forma multifuncional, contribuyendo a la mejoría de múltiples signos de la enfermedad.

En apoyo a esta idea, estudios recientes del laboratorio han demostrado que la infusión intravenosa semanal de un anticuerpo que neutraliza la actividad de Sfrp1 durante 2 y 5 meses en ratones APP;PS1 presintomáticos, es capaz de disminuir el acúmulo de placas amiloides, la neuroinflamación y de prevenir la pérdida de plasticidad sináptica (Esteve et al., 2019b).

En conclusión, los datos obtenidos durante esta tesis, junto con los resultados previos del laboratorio, indican que Sfrp1 es una buena diana terapéutica para el tratamiento de la EA. Además, de forma más amplia es posible que Sfrp1 pueda jugar un papel importante en otras enfermedades neurodegenerativas con neuroinflamación asociada.

CONCLUSIONES

1. La expresión de Sfrp1 es significativamente más elevada en pacientes con EA. Además, estos niveles incrementan con la progresión de la patología.
2. El ratón transgénico GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 representa un buen modelo para estudiar si y cómo, niveles de Sfrp1 superiores a los fisiológicos alteran la homeostasis del cerebro.
3. La sobre-expresión de Sfrp1 induce la aparición de rasgos neuroinflamatorios, como la activación de astrocitos y microglia, el aumento de expresión de citoquinas pro-inflamatorias, fosfo p38 y tau hiperfosforilado.
4. La sobre-expresión de Sfrp1 conlleva, con el paso del tiempo, a una disminución del árbol y espinas dendríticas en las neuronas granulares del hipocampo.
5. Las alteraciones morfológicas observadas en ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1 correlacionan con un deterioro cognitivo y un aumento de la ansiedad, rasgos que aparecen durante el envejecimiento.
6. La administración de una dieta grasa no agrava el deterioro cognitivo observado en los ratones GFAP-tTA/TRE-Sfrp1.

BIBLIOGRAFÍA

- ALFORD, S., PATEL, D., PERAKAKIS, N. & MANTZOROS, C. S. 2018. Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obes Rev*, 19, 269-280.
- ALTHUBITI, M., LEZINA, L., CARRERA, S., JUKES-JONES, R., GIBLETT, S. M., ANTONOV, A., BARLEV, N., SALDANHA, G. S., PRITCHARD, C. A., CAIN, K. & MACIP, S. 2014. Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis*, 5, e1528.
- ANDO, K., UEMURA, K., KUZUYA, A., MAESAKO, M., ASADA-UTSUGI, M., KUBOTA, M., AOYAGI, N., YOSHIOKA, K., OKAWA, K., INOUE, H., KAWAMATA, J., SHIMOHAMA, S., ARAI, T., TAKAHASHI, R. & KINOSHITA, A. 2011. N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 286, 7619-28.
- ARRANZ, A. M. & DE STROOPER, B. 2019. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol*, 18, 406-414.
- ASSINI, F. L., DUZZIONI, M. & TAKAHASHI, R. N. 2009. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res*, 204, 206-11.
- AUGUSTINE, C., GUNNERSEN, J., SPIRKOSKA, V. & TAN, S. S. 2001. Place- and time-dependent expression of mouse sFRP-1 during development of the cerebral neocortex. *Mech Dev*, 109, 395-7.
- AVILA, J., LLORENS-MARTIN, M., PALLAS-BAZARRA, N., BOLOS, M., PEREA, J. R., RODRIGUEZ-MATELLAN, A. & HERNANDEZ, F. 2017. Cognitive Decline in Neuronal Aging and Alzheimer's Disease: Role of NMDA Receptors and Associated Proteins. *Front Neurosci*, 11, 626.
- BAK, L. K., WALLS, A. B., SCHOUSBOE, A. & WAAGEPETERSEN, H. S. 2018. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J Biol Chem*, 293, 7108-7116.
- BAKER, D. J. & PETERSEN, R. C. 2018. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest*, 128, 1208-1216.
- BANYAI, L. & PATTHY, L. 1999. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci*, 8, 1636-42.
- BARONE, E., DI DOMENICO, F., CENINI, G., SULTANA, R., CINI, C., PREZIOSI, P., PERLUIGI, M., MANCUSO, C. & BUTTERFIELD, D. A. 2011. Biliverdin reductase--a protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 480-7.

BIBLIOGRAFÍA

- BELL, K. F., ZHENG, L., FAHRENHOLZ, F. & CUELLO, A. C. 2008. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging*, 29, 554-65.
- BENAVIDES-PICCIONE, R., FERNAUD-ESPINOSA, I., ROBLES, V., YUSTE, R. & DEFELIPE, J. 2013. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cereb Cortex*, 23, 1798-810.
- BERTRAM, L., LILL, C. M. & TANZI, R. E. 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68, 270-81.
- BISHOP, N. A., LU, T. & YANKNER, B. A. 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464, 529-35.
- BLALOCK, E. M., GEDDES, J. W., CHEN, K. C., PORTER, N. M., MARKESBERY, W. R. & LANDFIELD, P. W. 2004. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2173-8.
- BLOSS, E. B., JANSSEN, W. G., OHM, D. T., YUK, F. J., WADSWORTH, S., SAARDI, K. M., MCEWEN, B. S. & MORRISON, J. H. 2011. Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *J Neurosci*, 31, 7831-9.
- BOURNE, J. & HARRIS, K. M. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 17, 381-6.
- BOVOLENTA, P., ESTEVE, P., RUIZ, J. M., CISNEROS, E. & LOPEZ-RIOS, J. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*, 121, 737-46.
- BRAAK, H., ALAFUZOFF, I., ARZBERGER, T., KRETZSCHMAR, H. & DEL TREDICI, K. 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, 112, 389-404.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239-59.
- BUDNIK, V. & SALINAS, P. C. 2011. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 21, 151-9.
- BUECHLER, J. & SALINAS, P. C. 2018. Deficient Wnt Signaling and Synaptic Vulnerability in Alzheimer's Disease: Emerging Roles for the LRP6 Receptor. *Front Synaptic Neurosci*, 10, 38.
- BUSSIAN, T. J., AZIZ, A., MEYER, C. F., SWENSON, B. L., VAN DEURSEN, J. M. & BAKER, D. J. 2018. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 562, 578-582.

- CALDWELL, G. M., JONES, C., GENSBERG, K., JAN, S., HARDY, R. G., BYRD, P., CHUGHTAI, S., WALLIS, Y., MATTHEWS, G. M. & MORTON, D. G. 2004. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 64, 883-8.
- CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.
- CARICASOLE, A., COPANI, A., CARACI, F., ARONICA, E., ROZEMULLER, A. J., CARUSO, A., STORTO, M., GAVIRAGHI, G., TERSTAPPEN, G. C. & NICOLETTI, F. 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*, 24, 6021-7.
- CERPA, W., GAMBRILL, A., INESTROSA, N. C. & BARRIA, A. 2011. Regulation of NMDA-receptor synaptic transmission by Wnt signaling. *J Neurosci*, 31, 9466-71.
- CIANI, L., MARZO, A., BOYLE, K., STAMATAKOU, E., LOPES, D. M., ANANE, D., MCLEOD, F., ROSSO, S. B., GIBB, A. & SALINAS, P. C. 2015. Wnt signalling tunes neurotransmitter release by directly targeting Synaptotagmin-1. *Nat Commun*, 6, 8302.
- CLARKE, L. E. & BARRES, B. A. 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*, 14, 311-21.
- CLARKE, L. E., LIDDELOW, S. A., CHAKRABORTY, C., MUNCH, A. E., HEIMAN, M. & BARRES, B. A. 2018. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E1896-E1905.
- CLEVERS, H. & NUSSE, R. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, 149, 1192-205.
- COHEN, J. & TORRES, C. 2019. Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging Cell*, e12937.
- CRAWLEY, J. N. 2004. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 10, 248-58.
- CUADRADO, A. & NEBREDÁ, A. R. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 429, 403-17.
- CHIA, P. Z. & GLEESON, P. A. 2011. Intracellular trafficking of the beta-secretase and processing of amyloid precursor protein. *IUBMB Life*, 63, 721-9.
- CHILDS, B. G., GLUSCEVIC, M., BAKER, D. J., LABERGE, R. M., MARQUESS, D., DANANBERG, J. & VAN DEURSEN, J. M. 2017. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 718-735.
- CHINTA, S. J., WOODS, G., DEMARIA, M., RANE, A., ZOU, Y., MCQUADE, A., RAJAGOPALAN, S., LIMBAD, C., MADDEN, D. T., CAMPISI, J. & ANDERSEN, J. K. 2018. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep*, 22, 930-940.

- CHITRAMUTHU, B. P., BENNETT, H. P. J. & BATEMAN, A. 2017. Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. *Brain*, 140, 3081-3104.
- CHONG, J. M., UREN, A., RUBIN, J. S. & SPEICHER, D. W. 2002. Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J Biol Chem*, 277, 5134-44.
- CHUNG, W. S., CLARKE, L. E., WANG, G. X., STAFFORD, B. K., SHER, A., CHAKRABORTY, C., JOUNG, J., FOO, L. C., THOMPSON, A., CHEN, C., SMITH, S. J. & BARRES, B. A. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504, 394-400.
- DEBAISIEUX, S. & SCHIAVO, G. 2014. TIME for TMEM106B. *EMBO J*, 33, 405-6.
- DELLU, F., FAUCHEY, V., LE MOAL, M. & SIMON, H. 1997. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol Learn Mem*, 67, 112-20.
- DENG, Q., LIAO, R., WU, B. L. & SUN, P. 2004. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem*, 279, 1050-9.
- DICKSTEIN, D. L., KABASO, D., ROCHER, A. B., LUEBKE, J. I., WEARNE, S. L. & HOF, P. R. 2007. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*, 6, 275-84.
- DRIVER, J. A. & LU, K. P. 2010. Pin1: a new genetic link between Alzheimer's disease, cancer and aging. *Curr Aging Sci*, 3, 158-65.
- DUMITRIU, D., HAO, J., HARA, Y., KAUFMANN, J., JANSSEN, W. G., LOU, W., RAPP, P. R. & MORRISON, J. H. 2010. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J Neurosci*, 30, 7507-15.
- ELZI, D. J., SONG, M., HAKALA, K., WEINTRAUB, S. T. & SHIO, Y. 2012. Wnt antagonist SFRP1 functions as a secreted mediator of senescence. *Mol Cell Biol*, 32, 4388-99.
- ENNACEUR, A. & DELACOUR, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31, 47-59.
- ESTEVE, P. & BOVOLENTA, P. 2010. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. *Tohoku J Exp Med*, 221, 11-7.
- ESTEVE, P., CRESPO, I., KAIMAKIS, P., SANDONIS, A. & BOVOLENTA, P. 2019a. Sfrp1 Modulates Cell-signaling Events Underlying Telencephalic Patterning, Growth and Differentiation. *Cereb Cortex*, 29, 1059-1074.
- ESTEVE, P., RUEDA-CARRASCO, J., MATEO, M., MATIN-BERMEJO, M., DRAFFIN, J., PEREYRA, G., SANDONIS, A., CRESPO, I., MORENO, I., ASO, E., GARCIA-ESPACIA, P., E., G.-T., RABANO, A., FORTEA, J., ALCOLEA, D., LLEO, A., HENEKA, M. T., VALPUESTA, J. M.,

- ESTEBAN, J. A., FERRER, I., DOMINGUEZ, M. & BOVOLENTA, P. 2019b. Elevated levels of Secreted-Frizzled-Related-Protein 1 contribute to Alzheimer's disease pathogenesis. *Nature Neuroscience*.
- ESTEVE, P., SANDONIS, A., CARDOZO, M., MALAPEIRA, J., IBANEZ, C., CRESPO, I., MARCOS, S., GONZALEZ-GARCIA, S., TORIBIO, M. L., ARRIBAS, J., SHIMONO, A., GUERRERO, I. & BOVOLENTA, P. 2011a. SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci*, 14, 562-9.
- ESTEVE, P., SANDONIS, A., IBANEZ, C., SHIMONO, A., GUERRERO, I. & BOVOLENTA, P. 2011b. Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/beta-catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development*, 138, 4179-84.
- FELIX-ORTIZ, A. C., BEYELER, A., SEO, C., LEPLA, C. A., WILDES, C. P. & TYE, K. M. 2013. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, 79, 658-64.
- FERRANDO-MARTINEZ, S., RUIZ-MATEOS, E., DUDAKOV, J. A., VELARDI, E., GRILLARI, J., KREIL, D. P., MUNOZ-FERNANDEZ, M. A., VAN DEN BRINK, M. R. & LEAL, M. 2015. WNT signaling suppression in the senescent human thymus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 70, 273-81.
- FOLKE, J., PAKKENBERG, B. & BRUDEK, T. 2019. Impaired Wnt Signaling in the Prefrontal Cortex of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 56, 873-891.
- FORONJY, R., IMAI, K., SHIOMI, T., MERCER, B., SKLEPKIEWICZ, P., THANKACHEN, J., BODINE, P. & D'ARMIENTO, J. 2010. The divergent roles of secreted frizzled related protein-1 (SFRP1) in lung morphogenesis and emphysema. *Am J Pathol*, 177, 598-607.
- FRANK-CANNON, T. C., ALTO, L. T., MCALPINE, F. E. & TANSEY, M. G. 2009. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*, 4, 47.
- GAN, X. Q., WANG, J. Y., XI, Y., WU, Z. L., LI, Y. P. & LI, L. 2008. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol*, 180, 1087-100.
- GINHOUX, F. & PRINZ, M. 2015. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a020537.
- GODYN, J., JONCZYK, J., PANEK, D. & MALAWSKA, B. 2016. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep*, 68, 127-38.
- GOGOLLA, N., GALIMBERTI, I., DEGUCHI, Y. & CARONI, P. 2009. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron*, 62, 510-25.
- GOSSELIN, D. & RIVEST, S. 2018. Getting Too Old Too Quickly for Their Job: Senescent Glial Cells Promote Neurodegeneration. *Neuron*, 100, 777-779.

- HAASS, C. & SELKOE, D. J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 101-12.
- HACKAM, A. S. 2005. The Wnt signaling pathway in retinal degenerations. *IUBMB Life*, 57, 381-8.
- HARA, Y., MCKEEHAN, N. & FILLIT, H. M. 2019. Translating the biology of aging into novel therapeutics for Alzheimer disease. *Neurology*, 92, 84-93.
- HARDY, J. & SELKOE, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-6.
- HAUSLER, K. D., HORWOOD, N. J., CHUMAN, Y., FISHER, J. L., ELLIS, J., MARTIN, T. J., RUBIN, J. S. & GILLESPIE, M. T. 2004. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res*, 19, 1873-81.
- HAWKSHAW, N. J., HARDMAN, J. A., HASLAM, I. S., SHAHMALAK, A., GILHAR, A., LIM, X. & PAUS, R. 2018. Identifying novel strategies for treating human hair loss disorders: Cyclosporine A suppresses the Wnt inhibitor, SFRP1, in the dermal papilla of human scalp hair follicles. *PLoS Biol*, 16, e2003705.
- HENEKA, M. T., CARSON, M. J., EL KHOURY, J., LANDRETH, G. E., BROSSERON, F., FEINSTEIN, D. L., JACOBS, A. H., WYSS-CORAY, T., VITORICA, J., RANSOHOFF, R. M., HERRUP, K., FRAUTSCHY, S. A., FINSEN, B., BROWN, G. C., VERKHRATSKY, A., YAMANAKA, K., KOISTINAHO, J., LATZ, E., HALLE, A., PETZOLD, G. C., TOWN, T., MORGAN, D., SHINOHARA, M. L., PERRY, V. H., HOLMES, C., BAZAN, N. G., BROOKS, D. J., HUNOT, S., JOSEPH, B., DEIGENDESCH, N., GARASCHUK, O., BODDEKE, E., DINARELLO, C. A., BREITNER, J. C., COLE, G. M., GOLENBOCK, D. T. & KUMMER, M. P. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14, 388-405.
- HENEKA, M. T., KUMMER, M. P. & LATZ, E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, 14, 463-77.
- HENEKA, M. T. & O'BANION, M. K. 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 184, 69-91.
- HERING, H. & SHENG, M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2, 880-8.
- HERRUP, K. 2010. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci*, 30, 16755-62.
- HIESTER, B. G., GALATI, D. F., SALINAS, P. C. & JONES, K. R. 2013. Neurotrophin and Wnt signaling cooperatively regulate dendritic spine formation. *Mol Cell Neurosci*, 56, 115-27.
- HOANG, B., MOOS, M., JR., VUKICEVIC, S. & LUYTEN, F. P. 1996. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem*, 271, 26131-7.

- HONG, S., DISSING-OLESEN, L. & STEVENS, B. 2016. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 36, 128-34.
- HOOPER, P. L., DURHAM, H. D., TOROK, Z., HOOPER, P. L., CRUL, T. & VIGH, L. 2016. The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. *Cell Stress Chaperones*, 21, 745-53.
- HUNDHAUSEN, C., SCHULTE, A., SCHULZ, B., ANDRZEJEWSKI, M. G., SCHWARZ, N., VON HUNDELSHAUSEN, P., WINTER, U., PALIGA, K., REISS, K., SAFTIG, P., WEBER, C. & LUDWIG, A. 2007. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol*, 178, 8064-72.
- JAHN, H. 2013. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 15, 445-54.
- JANKOWSKY, J. L., FADALE, D. J., ANDERSON, J., XU, G. M., GONZALES, V., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., LEE, M. K., YOUNKIN, L. H., WAGNER, S. L., YOUNKIN, S. G. & BORCHELT, D. R. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*, 13, 159-70.
- JONES, B. J. & ROBERTS, D. J. 1968. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, 20, 302-4.
- KASAI, H., MATSUZAKI, M., NOGUCHI, J., YASUMATSU, N. & NAKAHARA, H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26, 360-8.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.
- KLAFKI, H. W., STAUFENBIEL, M., KORNUHUBER, J. & WILTFANG, J. 2006. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*, 129, 2840-55.
- KLAUS, A. & BIRCHMEIER, W. 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 387-98.
- KLEINBERGER, G., YAMANISHI, Y., SUAREZ-CALVET, M., CZIRR, E., LOHMANN, E., CUYVERS, E., STRUYFS, H., PETTKUS, N., WENNINGER-WEINZIERL, A., MAZAHARI, F., TAHIROVIC, S., LLEO, A., ALCOLEA, D., FORTEA, J., WILLEM, M., LAMMICH, S., MOLINUEVO, J. L., SANCHEZ-VALLE, R., ANTONELL, A., RAMIREZ, A., HENKA, M. T., SLEEGERS, K., VAN DER ZEE, J., MARTIN, J. J., ENGELBORGH, S., DEMIRTAS-TATLIDEDE, A., ZETTERBERG, H., VAN BROECKHOVEN, C., GURVIT, H., WYSS-CORAY, T., HARDY, J., COLONNA, M. & HAASS, C. 2014. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med*, 6, 243ra86.
- KOBAYASHI, K., LUO, M., ZHANG, Y., WILKES, D. C., GE, G., GRIESKAMP, T., YAMADA, C., LIU, T. C., HUANG, G., BASSON, C. T., KISPERT, A., GREENSPAN, D. S. & SATO, T. N. 2009. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol*, 11, 46-55.

- KRAEUTER, A. K., GUEST, P. C. & SARNYAI, Z. 2019. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*, 1916, 105-111.
- KRELL-ROESCH, J., RUIDER, H., LOWE, V. J., STOKIN, G. B., PINK, A., ROBERTS, R. O., MIELKE, M. M., KNOPMAN, D. S., CHRISTIANSON, T. J., MACHULDA, M. M., JACK, C. R., PETERSEN, R. C. & GEDA, Y. E. 2016. FDG-PET and Neuropsychiatric Symptoms among Cognitively Normal Elderly Persons: The Mayo Clinic Study of Aging. *J Alzheimers Dis*, 53, 1609-16.
- KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- KRITSILIS, M., S, V. R., KOUTSOUDAKI, P. N., EVANGELOU, K., GORGOULIS, V. G. & PAPADOPOULOS, D. 2018. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci*, 19.
- LEE, A. Y., HE, B., YOU, L., DADFARMAY, S., XU, Z., MAZIERES, J., MIKAMI, I., MCCORMICK, F. & JABLONS, D. M. 2004. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*, 23, 6672-6.
- LEE, H. X., AMBROSIO, A. L., REVERSADE, B. & DE ROBERTIS, E. M. 2006. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell*, 124, 147-59.
- LEE, J. K. & KIM, N. J. 2017. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules*, 22.
- LEYNS, L., BOUWMEESTER, T., KIM, S. H., PICCOLO, S. & DE ROBERTIS, E. M. 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, 88, 747-56.
- LI, C. H. & AMAR, S. 2007. Inhibition of SFRP1 reduces severity of periodontitis. *J Dent Res*, 86, 873-7.
- LICHTENTHALER, S. F. 2012. Alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein: proteolysis regulated by signaling pathways and protein trafficking. *Curr Alzheimer Res*, 9, 165-77.
- LIDDELOW, S. A., GUTTENPLAN, K. A., CLARKE, L. E., BENNETT, F. C., BOHLEN, C. J., SCHIRMER, L., BENNETT, M. L., MUNCH, A. E., CHUNG, W. S., PETERSON, T. C., WILTON, D. K., FROUIN, A., NAPIER, B. A., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M. S., ROWITCH, D. H., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., STEVENS, B. & BARRES, B. A. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541, 481-487.
- LINNARTZ, B. & NEUMANN, H. 2013. Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycocalyx. *Glia*, 61, 37-46.

- LOPEZ-RIOS, J., ESTEVE, P., RUIZ, J. M. & BOVOLENTA, P. 2008. The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Dev*, 3, 19.
- LUEPTOW, L. M. 2017. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*.
- LUNEMANN, J. D., NIMMERJAHN, F. & DALAKAS, M. C. 2015. Intravenous immunoglobulin in neurology--mode of action and clinical efficacy. *Nat Rev Neurol*, 11, 80-9.
- MACDONALD, B. T., TAMAI, K. & HE, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.
- MAIESE, K. 2017. Forkhead Transcription Factors: Formulating a FOXO Target for Cognitive Loss. *Curr Neurovasc Res*, 14, 415-420.
- MALINOW, R. & MALENKA, R. C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 25, 103-26.
- MALINVERNO, M., CARTA, M., EPIS, R., MARCELLO, E., VERPELLI, C., CATTABENI, F., SALA, C., MULLE, C., DI LUCA, M. & GARDONI, F. 2010. Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci*, 30, 16343-55.
- MANGIALASCHE, F., SOLOMON, A., WINBLAD, B., MECOCCHI, P. & KIVIPELTO, M. 2010. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*, 9, 702-16.
- MARCELLO, E., BORRONI, B., PELUCCHI, S., GARDONI, F. & DI LUCA, M. 2017. ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*, 21, 1017-1026.
- MARCOS, S., NIETO-LOPEZ, F., SANDONIS, A., CARDOZO, M. J., DI MARCO, F., ESTEVE, P. & BOVOLENTA, P. 2015. Secreted frizzled related proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms. *J Neurosci*, 35, 4729-40.
- MARTIN, M. G., PFRIEGER, F. & DOTTI, C. G. 2014. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep*, 15, 1036-52.
- MARUYAMA, J., NAGURO, I., TAKEDA, K. & ICHIJO, H. 2009. Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. *Curr Med Chem*, 16, 1229-35.
- MARZO, A., GALLI, S., LOPES, D., MCLEOD, F., PODPOLNY, M., SEGOVIA-ROLDAN, M., CIANI, L., PURRO, S., CACUCCI, F., GIBB, A. & SALINAS, P. C. 2016. Reversal of Synapse Degeneration by Restoring Wnt Signaling in the Adult Hippocampus. *Curr Biol*, 26, 2551-2561.
- MASTERS, C. L., BATEMAN, R., BLENNOW, K., ROWE, C. C., SPERLING, R. A. & CUMMINGS, J. L. 2015. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056.

- MATSUZAKI, M., HONKURA, N., ELLIS-DAVIES, G. C. & KASAI, H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-6.
- MATTSON, M. P. & ARUMUGAM, T. V. 2018. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab*, 27, 1176-1199.
- MCKINNEY, R. A. 2010. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J Physiol*, 588, 107-16.
- MCLEOD, F., MARZO, A., PODPOLNY, M., GALLI, S. & SALINAS, P. 2017. Evaluation of Synapse Density in Hippocampal Rodent Brain Slices. *J Vis Exp*.
- MELKONYAN, H. S., CHANG, W. C., SHAPIRO, J. P., MAHADEVAPPA, M., FITZPATRICK, P. A., KIEFER, M. C., TOMEI, L. D. & UMANSKY, S. R. 1997. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13636-41.
- MII, Y. & TAIRA, M. 2009. Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development*, 136, 4083-8.
- MORGAN, J. T., RAGHUNATHAN, V. K., CHANG, Y. R., MURPHY, C. J. & RUSSELL, P. 2015. The intrinsic stiffness of human trabecular meshwork cells increases with senescence. *Oncotarget*, 6, 15362-74.
- MORRISON, J. H. & BAXTER, M. G. 2012. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci*, 13, 240-50.
- MOSHER, K. I. & WYSS-CORAY, T. 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 88, 594-604.
- NAKAMURA, T., HOSOYAMA, T., MURAKAMI, J., SAMURA, M., UENO, K., KURAZUMI, H., SUZUKI, R., MIKAMO, A. & HAMANO, K. 2017. Age-related increase in Wnt inhibitor causes a senescence-like phenotype in human cardiac stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 487, 653-659.
- NEUMANN, H., KOTTER, M. R. & FRANKLIN, R. J. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132, 288-95.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.
- O'SHEA, A., COHEN, R. A., PORGES, E. C., NISSIM, N. R. & WOODS, A. J. 2016. Cognitive Aging and the Hippocampus in Older Adults. *Front Aging Neurosci*, 8, 298.
- OBERMEIER, B., DANEMAN, R. & RANSOHOFF, R. M. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*, 19, 1584-96.
- OKUYAMA, T., KITAMURA, T., ROY, D. S., ITOHARA, S. & TONEGAWA, S. 2016. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353, 1536-1541.

- PAOLICELLI, R. C., BOLASCO, G., PAGANI, F., MAGGI, L., SCIANNI, M., PANZANELLI, P., GIUSTETTO, M., FERREIRA, T. A., GUIDUCCI, E., DUMAS, L., RAGOZZINO, D. & GROSS, C. T. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333, 1456-8.
- PAOLICELLI, R. C. & FERRETTI, M. T. 2017. Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front Synaptic Neurosci*, 9, 9.
- PAPE, H. C. & PARE, D. 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev*, 90, 419-63.
- PELLOW, S. & FILE, S. E. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24, 525-9.
- PENZES, P., CAHILL, M. E., JONES, K. A., VANLEEUEWEN, J. E. & WOOLFREY, K. M. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14, 285-93.
- PINI, L., PIEVANI, M., BOCCHETTA, M., ALTOMARE, D., BOSCO, P., CAVEDO, E., GALLUZZI, S., MARIZZONI, M. & FRISONI, G. B. 2016. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev*, 30, 25-48.
- PINTO, L. & GOTZ, M. 2007. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol*, 83, 2-23.
- PROX, J., BERNREUTHER, C., ALTMEPPEN, H., GRENDL, J., GLATZEL, M., D'HOOGE, R., STROOBANTS, S., AHMED, T., BALSCHUN, D., WILLEM, M., LAMMICH, S., ISBRANDT, D., SCHWEIZER, M., HORRE, K., DE STROOPER, B. & SAFTIG, P. 2013. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci*, 33, 12915-28, 12928a.
- PURRO, S. A., GALLI, S. & SALINAS, P. C. 2014. Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. *J Mol Cell Biol*, 6, 75-80.
- QIN, H. & BENVENISTE, E. N. 2012. ELISA methodology to quantify astrocyte production of cytokines/chemokines in vitro. *Methods Mol Biol*, 814, 235-49.
- RADDE, R., BOLMONT, T., KAESER, S. A., COOMARASWAMY, J., LINDAU, D., STOLTZE, L., CALHOUN, M. E., JAGGI, F., WOLBURG, H., GENGLER, S., HAASS, C., GHETTI, B., CZECH, C., HOLSCHER, C., MATHEWS, P. M. & JUCKER, M. 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*, 7, 940-6.
- RANSOHOFF, R. M. & PERRY, V. H. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27, 119-45.

- REISS, K., MARETZKY, T., LUDWIG, A., TOUSSEYN, T., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. & SAFTIG, P. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J*, 24, 742-52.
- RING, S., WEYER, S. W., KILIAN, S. B., WALDRON, E., PIETRZIK, C. U., FILIPPOV, M. A., HERMS, J., BUCHHOLZ, C., ECKMAN, C. B., KORTE, M., WOLFER, D. P. & MULLER, U. C. 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27, 7817-26.
- RODRIGUEZ, J., ESTEVE, P., WEINL, C., RUIZ, J. M., FERMIN, Y., TROUSSE, F., DWIVEDY, A., HOLT, C. & BOVOLENTA, P. 2005. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci*, 8, 1301-9.
- ROSSO, S. B. & INESTROSA, N. C. 2013. WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. *Front Cell Neurosci*, 7, 103.
- ROSSO, S. B., SUSSMAN, D., WYNshaw-BORIS, A. & SALINAS, P. C. 2005. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci*, 8, 34-42.
- ROZYCKA, A. & LIGUZ-LECZYNAR, M. 2017. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse. *Aging Cell*, 16, 634-643.
- SAFTIG, P. & BOVOLENTA, P. 2015. Proteases at work: cues for understanding neural development and degeneration. *Front Mol Neurosci*, 8, 13.
- SAFTIG, P. & LICHTENTHALER, S. F. 2015. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol*, 135, 1-20.
- SALMINEN, A., KAUPPINEN, A. & KAARNIRANTA, K. 2012. Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*, 24, 835-45.
- SALTER, M. W. & STEVENS, B. 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*, 23, 1018-1027.
- SATOH, A., IMAI, S. I. & GUARENTE, L. 2017. The brain, sirtuins, and ageing. *Nat Rev Neurosci*, 18, 362-374.
- SATOH, J., KINO, Y., KAWANA, N., YAMAMOTO, Y., ISHIDA, T., SAITO, Y. & ARIMA, K. 2014. TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains. *Alzheimers Res Ther*, 6, 17.
- SCHAFER, D. P., LEHRMAN, E. K., HELLER, C. T. & STEVENS, B. 2014. An engulfment assay: a protocol to assess interactions between CNS phagocytes and neurons. *J Vis Exp*.
- SELKOE, D. J. & HARDY, J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8, 595-608.

- SELLGREN, C. M., GRACIAS, J., WATMUFF, B., BIAG, J. D., THANOS, J. M., WHITTREDGE, P. B., FU, T., WORRINGER, K., BROWN, H. E., WANG, J., KAYKAS, A., KARMACHARYA, R., GOOLD, C. P., SHERIDAN, S. D. & PERLIS, R. H. 2019. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci*, 22, 374-385.
- SEVIGNY, J., CHIAO, P., BUSSIÈRE, T., WEINREB, P. H., WILLIAMS, L., MAIER, M., DUNSTAN, R., SALLOWAY, S., CHEN, T., LING, Y., O'GORMAN, J., QIAN, F., ARASTU, M., LI, M., CHOLLATE, S., BRENNAN, M. S., QUINTERO-MONZON, O., SCANNEVIN, R. H., ARNOLD, H. M., ENGBER, T., RHODES, K., FERRERO, J., HANG, Y., MIKULSKIS, A., GRIMM, J., HOCK, C., NITSCH, R. M. & SANDROCK, A. 2016. The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537, 50-6.
- SHADYAB, A. H. & LACROIX, A. Z. 2015. Genetic factors associated with longevity: a review of recent findings. *Ageing Res Rev*, 19, 1-7.
- SHENG, M. & HOOGENRAAD, C. C. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 76, 823-47.
- SOFRONIEW, M. V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-47.
- SUDHOF, T. C. 2008. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455, 903-11.
- SUN, F., MAO, X., XIE, L., GREENBERG, D. A. & JIN, K. 2013. Neuroglobin protein is upregulated in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 36, 659-63.
- SUN, Y., JIN, K., MAO, X. O., XIE, L., PEEL, A., CHILDS, J. T., LOGVINOVA, A., WANG, X. & GREENBERG, D. A. 2005. Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain. *Neurobiol Aging*, 26, 275-8.
- SUZUKI, K., HAYASHI, Y., NAKAHARA, S., KUMAZAKI, H., PROX, J., HORIUCHI, K., ZENG, M., TANIMURA, S., NISHIYAMA, Y., OSAWA, S., SEHARA-FUJISAWA, A., SAFTIG, P., YOKOSHIMA, S., FUKUYAMA, T., MATSUKI, N., KOYAMA, R., TOMITA, T. & IWATSUBO, T. 2012. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, 76, 410-22.
- SWENSON, B. L., MEYER, F. M., BUSSIAN, T. J. & BAKER, D. J. 2019. Senescence in aging and disorders of the central nervous system. *Translational Medicine of Aging*, 3, 17-25.
- SZYMANSKI, M., WANG, R., FALLIN, M. D., BASSETT, S. S. & AVRAMOPOULOS, D. 2010. Neuroglobin and Alzheimer's dementia: genetic association and gene expression changes. *Neurobiol Aging*, 31, 1835-42.
- TAPIA-ROJAS, C. & INESTROSA, N. C. 2018. Wnt signaling loss accelerates the appearance of neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease in J20-APP transgenic and wild-type mice. *J Neurochem*, 144, 443-465.

- TOGASHI, H., ABE, K., MIZOGUCHI, A., TAKAOKA, K., CHISAKA, O. & TAKEICHI, M. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, 35, 77-89.
- TREVANT, B., GAUR, T., HUSSAIN, S., SYMONS, J., KOMM, B. S., BODINE, P. V., STEIN, G. S. & LIAN, J. B. 2008. Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. *J Cell Physiol*, 217, 113-26.
- TURKO, P., GROBERMAN, K., BROWA, F., COBB, S. & VIDA, I. 2019. Differential Dependence of GABAergic and Glutamatergic Neurons on Glia for the Establishment of Synaptic Transmission. *Cereb Cortex*, 29, 1230-1243.
- UREN, A., REICHSMAN, F., ANEST, V., TAYLOR, W. G., MURAISSO, K., BOTTARO, D. P., CUMBERLEDGE, S. & RUBIN, J. S. 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 275, 4374-82.
- VAN DER ZEE, E. A. 2015. Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev*, 50, 77-85.
- VASSAR, R. 2013. ADAM10 prodomain mutations cause late-onset Alzheimer's disease: not just the latest FAD. *Neuron*, 80, 250-3.
- WAHL, D., COGGER, V. C., SOLON-BIET, S. M., WAERN, R. V., GOKARN, R., PULPITEL, T., CABO, R., MATTSON, M. P., RAUBENHEIMER, D., SIMPSON, S. J. & LE COUTEUR, D. G. 2016. Nutritional strategies to optimise cognitive function in the aging brain. *Ageing Res Rev*, 31, 80-92.
- WALSH, N. C., REINWALD, S., MANNING, C. A., CONDON, K. W., IWATA, K., BURR, D. B. & GRAVALLESE, E. M. 2009. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*, 24, 1572-85.
- WANG, S., KRINKS, M., LIN, K., LUYTEN, F. P. & MOOS, M., JR. 1997. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*, 88, 757-66.
- WANG, W. H., MCNATT, L. G., PANG, I. H., MILLAR, J. C., HELLBERG, P. E., HELLBERG, M. H., STEELY, H. T., RUBIN, J. S., FINGERT, J. H., SHEFFIELD, V. C., STONE, E. M. & CLARK, A. F. 2008. Increased expression of the WNT antagonist sFRP-1 in glaucoma elevates intraocular pressure. *J Clin Invest*, 118, 1056-64.
- WYSS-CORAY, T. 2016. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 539, 180-186.
- XAVIER, C. P., MELIKOVA, M., CHUMAN, Y., UREN, A., BALJINNYAM, B. & RUBIN, J. S. 2014. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/beta-catenin signaling. *Cell Signal*, 26, 94-101.

- XU, N., ZHOU, W. J., WANG, Y., HUANG, S. H., LI, X. & CHEN, Z. Y. 2015. Hippocampal Wnt3a is Necessary and Sufficient for Contextual Fear Memory Acquisition and Consolidation. *Cereb Cortex*, 25, 4062-75.
- YANKNER, B. A., LU, T. & LOERCH, P. 2008. The aging brain. *Annu Rev Pathol*, 3, 41-66.
- ZHANG, P., KISHIMOTO, Y., GRAMMATIKAKIS, I., GOTTIMUKKALA, K., CUTLER, R. G., ZHANG, S., ABDELMOHSEN, K., BOHR, V. A., MISRA SEN, J., GOROSPE, M. & MATTSON, M. P. 2019. Senolytic therapy alleviates Abeta-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*, 22, 719-728.
- ZHANG, Y. W., THOMPSON, R., ZHANG, H. & XU, H. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4, 3.
- ZHU, X., LI, X., ZHU, M., XU, K., YANG, L., HAN, B., HUANG, R., ZHANG, A. & YAO, H. 2018. Metalloprotease Adam10 suppresses epilepsy through repression of hippocampal neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 15, 221.